



Title	Studies on molecular mechanisms of SNAP-23 in phagocytosis(本文)
Author(s)	櫻井, 千恵
Citation	
Issue Date	2014-03-25
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/610
Rights	© The Author(s)
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2023-05-05T17:40:20Z

**Studies on molecular mechanisms
of SNAP-23 in phagocytosis**

**ファゴサイトーシスにおける
SNAP-23 の分子機構に関する研究**

櫻井千恵

福島県立医科大学 医学部附属生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門
大学院医学研究科 医学専攻

目 次

1.	概要	1
2.	序	3
2.1	ファゴサイトーシス	3
2.1.1	食細胞とその特徴	3
2.1.2	ファゴサイトーシスと抗原提示	3
2.1.3	ファゴサイトーシスの反応機構	4
2.2	ファゴサイトーシスにおける SNARE タンパク質を介した膜融合反応	8
2.2.1	SNARE タンパク質と SNARE 仮説	8
2.2.2	ファゴソーム形成に関与する SNARE タンパク質	11
2.2.3	ファゴソーム成熟に関与する SNARE タンパク質	12
2.3	研究の目的	14
3.	実験結果	15
3.1	マクロファージにおいて SNAP-23 が ファゴサイトーシスへ及ぼす影響の検証	15

3.1.1	mVenus-SNAP-23 を過剰発現した マクロファージの作製	15
3.1.2	SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの 形成過程へ及ぼす影響についての検証 [1]	27
3.1.3	SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの 成熟過程へ及ぼす影響についての検証	33
3.1.4	SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの 形成過程へ及ぼす影響についての検証 [2]	47
3.1.5	単離ファゴソームの生化学的解析	51
3.1.6	SNAP-23 と相互作用する SNARE タンパク質の解析	53
3.1.7	低分子干渉 RNA 法による SNAP-23 の発現抑制	57
3.1.8	SNAP-23 の発現抑制が活性酸素種の産生に 及ぼす影響の検証	64
3.1.9	SNAP-23 の発現抑制がファゴソームの 形成過程へ及ぼす影響についての検証	68
3.1.10	SNAP-23 の発現抑制がファゴソームの 成熟過程へ及ぼす影響についての検証	70
3.1.11	SNAP-23 の分子内 FRET 解析	84
3.2	SNAP-23 のリン酸化がファゴサイトーシスへ 及ぼす影響の検証	99
3.2.1	mVenus-SNAP-23 変異体を発現した マクロファージの作製	99

3.2.2	SNAP-23 のリン酸化がファゴソーム形成過程へ 及ぼす影響についての検証·····	110
3.2.3	SNAP-23 のリン酸化がファゴソームの成熟過程へ 及ぼす影響についての検証·····	114
3.2.4	リン酸化が SNAP-23 と他の SNARE タンパク質 との相互作用に及ぼす影響についての解析·····	116
3.2.5	mVenus 融合タンパク質の構造変化に関する解析·····	118
3.2.6	SNAP-23 のリン酸化酵素に関する検討·····	126
4.	実験考察 ·····	132
5.	実験方法 ·····	141
6.	謝辞 ·····	159
7.	略語 ·····	160
8.	引用文献 ·····	163

1. 概要

マクロファージや好中球、樹状細胞といった食細胞に見られるファゴサイトーシス（貪食）は、病原微生物などをファゴソーム（食胞）に取り込み、殺菌・分解する生体防御反応の一つである。ファゴソームは、エンドソームやライソゾームなどの細胞内小器官（オルガネラ）と融合を繰り返すことで活性酸素を発生する分子装置や種々の加水分解酵素を獲得しつつ成熟する。ファゴソームの形成や成熟の過程は複雑な膜融合反応によって進行するが、その分子機構はよくわかっていない。本研究では、膜融合反応に機能する SNARE タンパク質の一つで、マクロファージの細胞膜に局在する SNAP-23 の機能解析を行うことで、【1】ファゴソームの形成や成熟の分子機構、【2】その調節機構、を明らかにすることを目的とした。

本研究では【1】の解明のため、N 末端側に蛍光タンパク質 mVenus を付加した SNAP-23 (mV-S23) や SNAP-23 の C 末端 8 アミノ酸を欠失させた不活性型変異体 (mV-S23 Δ C8) を発現する J774 細胞（マウスのマクロファージ由来）株を樹立して実験に用いた。これらの細胞株を用いて SNAP-23 がファゴサイトーシスに及ぼす影響を調べたところ、① SNAP-23 の過剰発現はファゴサイトーシスにおける取り込みおよびファゴソームの成熟を亢進した。また、②低分子干渉 RNA (siRNA) で SNAP-23 の発現を抑制した J774 細胞では、ファゴサイトーシスにおける取り込みとファゴソーム成熟の両過程が阻害された。①と②から SNAP-23 はファゴサイトーシス反応におけるファゴソームの形成および成熟に機能していると考えられた。次に、③実際にファゴソーム膜上で SNAP-23 が機能しているかを調べるため FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）解析を行ったところ、SNARE タンパク質の一つである VAMP7 を過剰発現した場合に顕著な FRET シグナルの増加が見られた。このことから、SNAP-23 はファゴソーム膜上で膜融合にともなう立体

構造変化を起こしていること、つまり、膜融合装置として実際に機能していることが示唆された。

続いて、【2】の解明のため、種間で保存される SNAP-23 の Ser95 のリン酸化に着目し解析を行った。この部位をアラニン残基（mV-S23 S95A：非リン酸化型）やアスパラギン酸残基（mV-S23 S95D：疑似リン酸化型）に置換した SNAP-23 変異体を発現する J774 細胞株を樹立し、④ファゴサイトーシス効率およびファゴソームの成熟を検証したところ、mV-S23 S95A 細胞では、コントロール細胞と比べた場合に mV-S23 細胞と同程度の亢進が見られたが、mV-S23 S95D 細胞では有意に低下していた。また、⑤FRET 解析を行ったところ、S95D 変異体は定常状態において S95A 変異体では見られない FRET シグナルの上昇が観察された。④と⑤の結果から、SNAP-23 は Ser95 のリン酸化により立体構造を大きく変化することで機能が制御される可能性が考えられた。次に、SNAP-23 のファゴサイトーシスにおけるリン酸化酵素同定のため、エキソサイトーシス（開口分泌）において SNAP-23 をリン酸化することが報告された IKK2 に着目して検討を行った。⑥IKK2 を過剰発現させた場合のファゴソーム膜上での FRET 解析を③と同様に行ったところ、細胞膜上では見られない FRET シグナルの上昇が観察され、これは IKK2 に特異的な阻害剤で抑制された。つまり、IKK2 がファゴソーム膜上の SNAP-23 の機能を制御するリン酸化酵素の候補の一つと考えられた。

以上より、SNAP-23 は膜融合装置としてファゴサイトーシス反応に機能すること、また、その機能は、SNAP-23 の立体構造に影響する Ser95 のリン酸化状態により制御されていることが明らかとなった。

2. 序

2.1 ファゴサイトーシス

2.1.1 食細胞とその特徴

食細胞は、生体防御反応において細菌・真菌などの病原微生物をファゴサイトーシス（貪食）によって細胞内部に取り込み処理する役割を担う中心的な細胞であり、マクロファージ，好中球，樹状細胞などが挙げられる。生体に病原微生物などの異物が侵入すると、感染の初期段階で好中球が侵入局所に動員され、マクロファージは遅れて誘導される。マクロファージは好中球に比べると殺菌能力は劣るが、異物を取り込んだ後で分解産物を抗原としてT細胞に提示する能力を持つ。さらに、マクロファージはアポトーシス細胞を貪食することもできる。一方、樹状細胞は抗原提示を主な機能として有しており、マクロファージや好中球と比べると貪食作用はそれほど強力ではない。樹状細胞はリンパ組織だけでなく、全身に広く分布している。

2.1.2 ファゴサイトーシスと抗原提示

ファゴサイトーシスは食細胞に特徴的な生体防御反応の一つであり、病原微生物などの異物を細胞内に取り込み、脂質二重膜で覆われたファゴソーム（食胞）を形成し殺菌・分解する反応である。また通常のエンドサイトーシスとは異なり、比較的大きなもの（約

0.5 μm 以上) を取り込む点に特徴がある。形成されたファゴソームは、細胞内のエンドソームやライソゾームなどの細胞内小器官（オルガネラ）と融合を繰り返してファゴライソゾームへと成熟する（ファゴソームの成熟）^[1]。この過程でファゴソームは、活性酸素や酸性環境を獲得し異物を殺菌するとともに、ライソゾームからの種々の酸性加水分解酵素によって分解処理を行う。分解されたものは生命維持に再利用され、一部は抗原として主要組織適合抗原複合体クラス I (MHC-I), クラス II (MHC-II) によって T 細胞へ提示される^[1]。

抗原提示は主にマクロファージと樹状細胞によって行われるが、後者の方がその提示能力がより高いことが知られている^[2]。ファゴソーム内でペプチドまで分解された異物は、エンドソームから送られてくる MHC-II に結合し細胞表面に運ばれ、CD4+T 細胞に抗原提示される。その結果、活性化された T 細胞は種々のサイトカインを産生し B 細胞による抗体産生などを誘導する。また、ファゴソーム内部で分解されたものが MHC-I で抗原提示される場合（クロスプレゼンテーション）も知られている。この場合、抗原は何らかの機構でファゴソームから細胞質に送られ、プロテアソームでペプチド抗原まで分解される。その後、抗原は抗原ペプチド輸送体（TAP）を介してオルガネラ内部に移送され、MHC-I と結合し細胞表面に運ばれ CD8+T 細胞に抗原提示される。マクロファージに比べ樹状細胞の方が抗原提示能力は高いが、この差はファゴソーム成熟の分子機構の違いに起因することなどが明らかになっている^[2]。一方、マクロファージもインターフェロン γ に暴露されると抗原提示能力が亢進することがわかってきた^[3]が、その詳細な機構の解明は今後の課題である。

2.1.3 ファゴサイトーシスの反応機構

ファゴサイトーシスは、①ファゴソームの形成、②ファゴソームの成熟、の二つの反

応に大きく分けることができる。①の反応は比較的解明が進んでおり、反応の初期では異物に特異的なリガンド分子を宿主の細胞膜上の対応する受容体が認識することにより、細胞膜直下でアクチンの再編成が起こり異物を囲い込むように細胞膜が隆起（ファゴサイティックカップの形成）する（図 2-1-1）^[4]。この反応では、アクチンを制御する低分子量 GTP 結合タンパク質である Rho, Cdc42, Rac などが複雑に機能していることがわかってきている^[4]。また、ファゴサイティックカップやファゴソームの形成には膜成分が必要不可欠であるが、これは細胞膜からだけでは不足であり、細胞内のオルガネラからも供給される必要がある。内部のオルガネラからの膜供給は、異物が結合した細胞膜直下でエンドソームやライソゾームの局所的なエキソサイトーシスが行われることで行われている^[5]。さらに、小胞体（ER）からの膜供給経路も存在し生理的に重要であることが報告された^[6, 7]。これは精製ファゴソームのプロテオーム解析やファゴサイトーシスの電子顕微鏡観察などから証明された^[8, 9]。その生理的な意義は、膜成分の供給だけではなく通常 ER に局在する MHC-I 分子群やタンパク質の ER 内腔と細胞質の移送に関わる Sec61 や TAP などの分子をファゴソームに局在化させることにあると考えられている^[10, 11]。これは、これらの分子がファゴソームに局在することで、前述したクロスプレゼンテーションの反応（外来異物からの抗原ペプチドを MHC-I に結合させて抗原提示する）をうまく説明できるという点で魅力的なモデルである^[1, 12]。この ER の関与については否定的な報告もあり^[13]ER からの膜供給モデルは大きな論争になっていたが、本研究室等での ER 局在 SNARE タンパク質の解析から、その役割が明らかにされつつある^[14, 15]。

一方、ファゴソームは形成後、エンドソームやライソゾームと融合を繰り返してファゴライソゾームへと成熟する（図 2-1-1）。成熟初期の段階では、NADPH オキシダーゼ（NOX2）複合体がファゴソーム膜上に形成され内部に活性酸素種（ROS）を供給し病原微生物の殺菌に機能する。さらにファゴソーム膜上には液胞型プロトン輸送性 ATPase（V-ATPase）が運ばれ、ATP の加水分解によりプロトン濃度勾配が形成され内部は酸性

化される。このようにファゴソームの成熟にともなって内部環境が酸性化し、最終的にライソゾームから運ばれる種々の酸性加水分解酵素が機能し病原微生物は分解される。これら成熟過程の反応については、膜融合を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質の Rab ファミリーに属するいくつかのタンパク質についての解析が先行している^[16]。

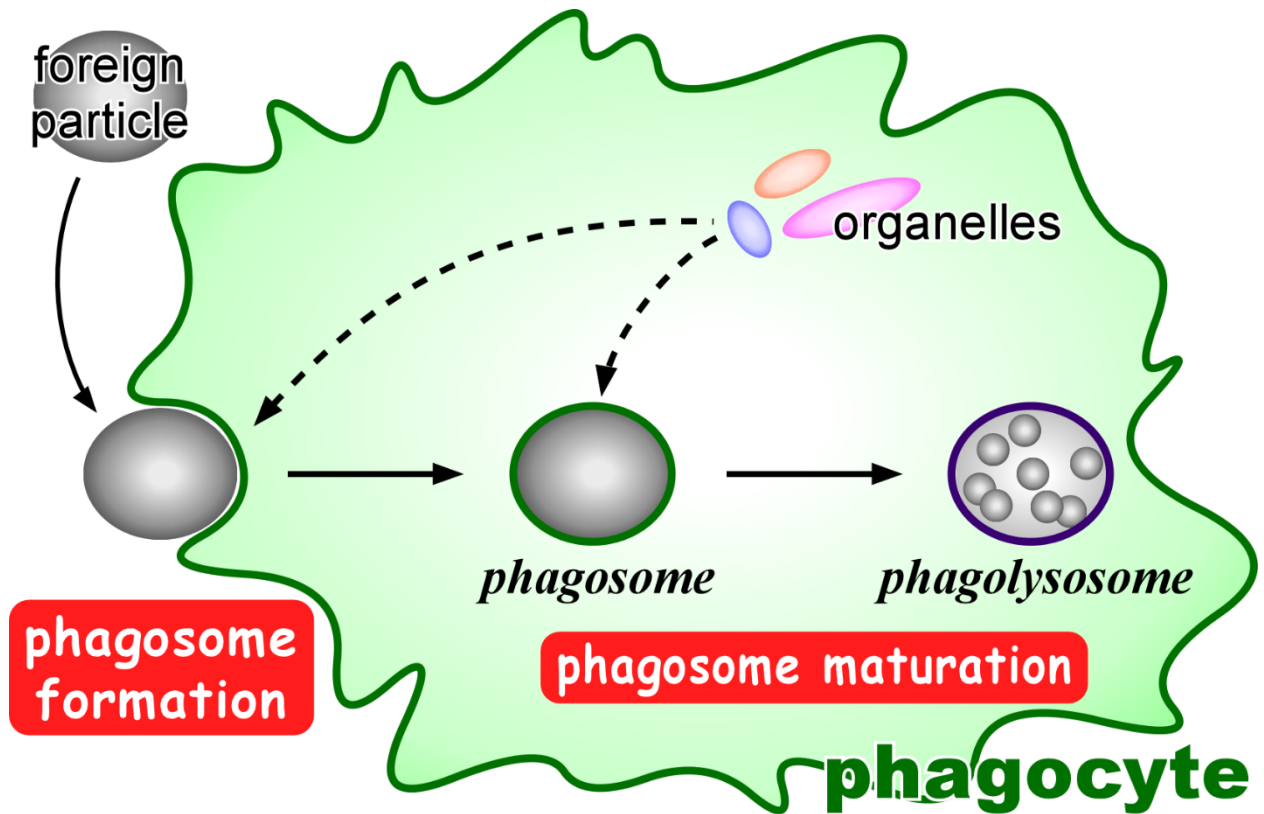


図 2-1-1. ファゴサイトーシスの概略

病原微生物が食細胞膜上の受容体に結合すると直下でアクチンの再編成が起こり、膜を押し上げ異物を囲むようにファゴサイティックカップが形成され、最終的に細胞内に取り込まれる。取り込みによって形成されたファゴソームは、順次エンドソームやライソゾームと融合しファゴライソゾームへと成熟する。ファゴサイトーシスによって分解されたものは生命維持や T 細胞への抗原提示のために利用される。

2.2 ファゴサイトーシスにおける SNARE タンパク質を介した膜融合反応

2.2.1 SNARE タンパク質と SNARE 仮説

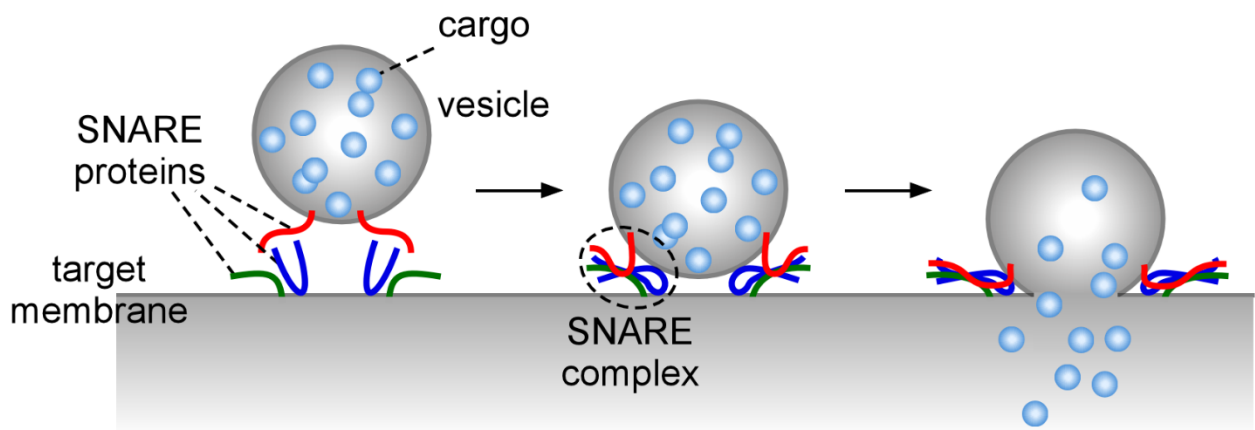
細胞内に存在する ER やゴルジ体などオルガネラ間の物質のやり取りは、一般に袋状の小胞を介して行われる（小胞輸送）。この輸送は、オルガネラの正常な機能発現やその維持のため厳密に制御されていると考えられる。小胞輸送は、①あるオルガネラから積み荷を含んだ小胞が出芽し、②積み荷を運ぶべきターゲットとなるオルガネラへ小胞が方向付けされ、③そのオルガネラ膜に小胞が結合し膜融合することで積み荷を送り渡す（図 2-2-1）、という三つの素反応から成る。

SNARE (soluble NSF attachment protein receptors) タンパク質（図 2-2-1）は、③の反応において小胞の膜とターゲットとなるオルガネラの膜との融合に機能するタンパク質として発見された^[17]。SNARE タンパク質は、膜融合装置として機能するばかりでなく融合の特異性も担う分子であるため、オルガネラごとに複数の分子が存在する^[18, 19]。そのため便宜的に、小胞に存在するものを vesicle membrane 局在 SNARE (v-SNARE)、ターゲットとなるオルガネラ膜に存在するものを target membrane 局在 SNARE (t-SNARE) と分類される。この v-SNARE と t-SNARE が正しい組合せで複合体（SNARE 複合体）を形成した場合に膜融合反応が起こり、融合後にその複合体は SNAP とシャペロン様活性を持つ NSF の働きで解離し再利用される（SNARE 仮説）。

この v-SNARE と t-SNARE という分類は、SNARE 仮説の説明や理解には都合が良いものであるが、実際にはある状態では v-SNARE がターゲット膜に存在することもあるため、最近では R-SNARE と Q-SNARE といった分類がされつつある。X 線結晶解析に

より神経終末でエキソサイトーシスに機能する SNARE 複合体の構造が解かれ、その複合体形成領域の中心に存在するアミノ酸残基が同定されたことから、そのアミノ酸残基にアルギニンを持つものを R-SNARE、グルタミンを持つものを Q-SNARE と呼ぶよう提唱されている。SNARE タンパク質は、SNARE モチーフと呼ばれる領域で結合し融合を引き起こすと考えられており、融合には一つの R-SNARE と三つの Q-SNARE による複合体形成が必要である。Q-SNARE には syntaxin ファミリーと SNAP-25 ファミリー、R-SNARE には VAMP (synaptobrevin) ファミリーといったタンパク質群が存在することが明らかになっている。ファゴサイトーシスの各ステップは、内部のオルガネラとの部分的な膜融合反応が複雑な制御のもと整然と進行すること予想されるが、そこで機能する SNARE タンパク質の詳細な分子機構や融合における組合せなどはわかっていない。

vesicular transport



SNARE proteins

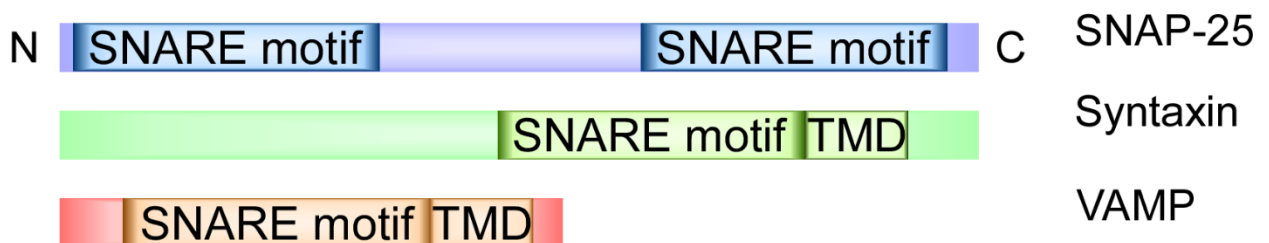


図 2-2-1. 小胞輸送と SNARE タンパク質

- (上) 小胞輸送において SNARE タンパク質は、小胞の膜とターゲットとなるオルガネラの膜との融合に機能する。小胞に存在する SNARE タンパク質と、オルガネラ膜に存在する SNARE タンパク質とが正しい組合せで複合体 (SNARE 複合体) を形成した場合に膜融合反応が起こる。
- (下) SNARE タンパク質には、SNAP-25 ファミリー, syntaxin ファミリー, VAMP ファミリーといったタンパク質群が存在する。SNAP-25 ファミリーは分子内に二つの SNARE モチーフを持つことが知られている。syntaxin ファミリーと VAMP ファミリーは C 末端付近に膜貫通領域 (transmembrane domain : TMD) を持つ。

2.2.2 ファゴソーム形成に関与する SNARE タンパク質

ファゴサイトーシスにおけるファゴソーム形成には、内部のオルガネラから細胞膜へ膜成分が供給される。その際には、細胞膜と供給されるオルガネラ膜に存在するそれぞれの SNARE タンパク質の特異的な複合体形成と膜融合が起こることが予想される。前述のように、ファゴソーム形成時における膜成分は大きく分けてエンドソーム・ライソゾームからの供給経路と ER からの供給経路があり、それぞれに機能する SNARE タンパク質の一端が明らかになってきている（表 2-2-1）。

エンドソーム・ライソゾームからの供給経路には、R-SNARE である VAMP ファミリーに属する VAMP3, VAMP7, VAMP8 などの SNARE タンパク質が関与している。マクロファージでは、VAMP3（リサイクリングエンドソーム局在）と VAMP7（後期エンドソーム・ライソゾーム局在）はファゴサイトーシスにポジティブに機能する^[5, 20, 21]。また樹状細胞では、VAMP7 と VAMP8（後期エンドソーム・ライソゾーム局在）がファゴソーム形成に抑制的に機能することがわかっている^[22]。食細胞の種類で VAMP7 の機能が異なる点や、それぞれの SNARE 複合体形成のパートナーと成り得る細胞膜局在の SNARE タンパク質については不明である。

ER から膜成分が供給される経路では、ER 局在の R-SNARE である Sec22b と Q-SNARE である syntaxin18 が関与しファゴソーム形成に機能することが、Becker ら^[23]、および当研究室での研究^[14]によって明らかにされている。さらに、Sec22b の場合にはそれ自身の構造変化で syntaxin18 を調節していることを、本研究室では報告した^[24]。これら ER 局在 SNARE タンパク質のファゴサイトーシスにおける機能解析とその結果は、ファゴソーム形成への ER の関与モデルを強く支持するものである。しかし、エンドソーム・ライソゾーム経路と同様に、細胞膜でパートナーとして機能する SNARE タンパク質の正体はわかっていない。

2.2.3 ファゴソーム成熟に関与する SNARE タンパク質

ファゴソームは初期エンドソーム，後期エンドソーム，そしてライソゾームと順次融合してファゴライソゾームへと成熟するが、この過程における膜融合反応にも SNARE タンパク質の関与が予想される（表 2-2-1）。実際に、この過程で機能する SNARE タンパク質として、Q-SNARE である syntaxin7（後期エンドソーム・ライソゾーム局在）と syntaxin13（リサイクリングエンドソーム・初期エンドソーム局在）についての報告がある^[25]。syntaxin13 はファゴサイトーシスの初期に一過的にファゴソーム膜上にリクルートされ、syntaxin7 は syntaxin13 が完全に消失した後でファゴソームにリクルートされる。また、これら SNARE タンパク質の細胞質領域の過剰発現はファゴソーム形成には影響せず、ライソゾームタンパク質のファゴソーム局在化といった成熟過程に阻害的に影響した。これらの結果から、syntaxin7 と syntaxin13 はファゴソーム成熟における膜融合反応に機能することが明らかにされた。しかし、syntaxin13 がファゴソームから解離する反応やこれらと複合体を形成するファゴソーム膜上の SNARE タンパク質の存在や融合の調節機構については全くわかっていない。また、樹状細胞ではファゴソームの成熟にも ER からの膜融合が必要で、そのステップに Sec22b が関与することが報告されている^[15]。

SNARE タンパク質ではないが、やはり膜融合反応に重要な働きをする Rab ファミリーのいくつかの分子がファゴソーム成熟過程に機能することが明らかにされている。Rab5（初期エンドソーム局在）は形成初期のファゴソームに一過的に局在し、入れ替わるように Rab7（後期エンドソーム・ライソゾーム局在）が局在して後期エンドソームやライソゾームとの融合が起こることがわかっている^[26]。これらの局在化のプロファイルは前述した syntaxin7 と syntaxin13 の場合とよく一致していて興味深い。また、これらの Rab タンパク質の機能は、阻害剤を用いた解析からホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3K）の活性によって調節されていることも明らかになっている^[27]。

表 2-2-1. ファゴサイトーシスで機能する SNARE タンパク質

これまでにマクロファージのファゴサイトーシスにおいて機能することが報告されている SNARE タンパク質。その組合せに関しては不明であるが、ファゴソーム形成過程において、VAMP3, VAMP7, Sec22b, syntaxin18 などの関与が報告されている。また、ファゴソームの成熟過程では syntaxin7, syntaxin13 が関与することがわかっている。

SNARE タンパク質	SNARE の種類	機能する過程	局在
Sec22b	R-SNARE	ファゴソーム形成・成熟 ^[23]	小胞体
D12	Q-SNARE	ファゴソーム形成 ^[14]	小胞体
VAMP3	R-SNARE	ファゴソーム形成 ^[20]	リサイクリングエンドソーム
VAMP7	R-SNARE	ファゴソーム形成 ^[21]	後期エンドソーム・ライソゾーム
syntaxin4	Q-SNARE	ファゴソーム形成 ^[28]	細胞膜
syntaxin7	Q-SNARE	ファゴソーム成熟 ^[25]	後期エンドソーム・ライソゾーム
syntaxin13	Q-SNARE	ファゴソーム成熟 ^[25]	リサイクリングエンドソーム・初期エンドソーム
syntaxin18	Q-SNARE	ファゴソーム形成 ^[14]	小胞体
SNAP-23	Q-SNARE	?	細胞膜

2.3 研究の目的

これまでのファゴソーム形成に機能する細胞膜局在 SNARE タンパク質を解析する過程で、その予備的実験から Q-SNARE である SNAP-23 がファゴサイトーシスに機能する新規知見を得た。そこで本研究では、SNAP-23 に着目しファゴサイトーシスにおける機能解明を目的とした。

SNAP-23 は細胞膜局在でどの細胞にも存在する SNARE タンパク質であり、分泌小胞や分泌顆粒などのエキソサイトーシスに機能すると考えられている。好中球では、細胞外刺激によって引き起こされる ROS の細胞外放出に細胞膜局在の syntaxin4 とともに SNAP-23 が機能することが明らかになっている^[29, 30]。好中球の場合、ROS を産生する NOX2 複合体の因子のいくつかは細胞内の特殊顆粒に局在しており、SNAP-23 はそのエキソサイトーシスに関与する。また、インターフェロン γ で活性化されたマクロファージでは、ファゴサイトーシス時に腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) を含む小胞が細胞膜に輸送されるが、その融合にも VAMP3 や syntaxin4 とともに SNAP-23 が機能することが報告されている^[31]。しかしこの報告では、SNAP-23 が VAMP3 との複合体を形成する結果だけで、その機能解析は全く行われていない。

このように SNAP-23 が実際にファゴソーム形成に関与するのか、そしてファゴソームに局在するのか、またファゴソーム成熟過程でファゴソーム膜上の SNARE タンパク質として機能するのかなど未解明な問題が多い。したがって、SNAP-23 の機能とその制御機構の解明は、生体防御の最前線で繰り広げられるファゴサイトーシス反応を理解する上で極めて重要な研究課題の一つであると考えられる。

3. 実験結果

3.1 マクロファージにおいて SNAP-23 がファゴサイトーシスへ及ぼす影響の検証

3.1.1 mVenus-SNAP-23 を過剰発現したマクロファージの作製

mVenus-SNAP-23 の構造と安定発現株の樹立

SNAP-23 は、細胞膜局在の SNARE タンパク質でどの細胞にも存在することから、調節性分泌経路だけでなく構成性分泌経路でも開口放出（エキソサイトーシス）に機能すると考えられている。構造的な特徴から、神経細胞特異的に発現している SNAP-25 のファミリーに分類され、その分子内に膜融合に関与する α ヘリックスを形成する配列（Q-SNARE モチーフ）を二つ持つ。SNAP-23 には疎水性アミノ酸残基からなる膜貫通領域はなく、分子の中間領域に存在する五つのシステイン残基に脂質修飾を受けて細胞膜と結合している（図 3-1-1-1）。実際にこれらのシステイン残基をセリン残基に置換すると、膜には結合できず細胞質に局在するようになることを確認している（未発表）。SNAP-25 は、ボツリヌス菌が産生する A 型ボツリヌストキシン（神経毒）によって C 末端部分が切断され不活性化され、エキソサイトーシスが阻害される。一方、SNAP-23 の場合は A 型ボツリヌストキシンによる切断は受けないが、SNAP-25 が受ける切断に相当する C 末端の 8 アミノ酸残基を欠失させた変異体（SNAP-23 Δ C8）は、やはりエキソサイトーシスにおいて機能しなくなることが知られている^[32]。

本実験では、ファゴサイトーシスやファゴソームの成熟過程における SNAP-23 の機能

解析を行うために、野生型と SNAP-23 Δ C8 のそれぞれの N 末端側に黄色蛍光タンパク質である mVenus を付加した融合タンパク質（mVenus-SNAP-23 : mV-S23 , mVenus-SNAP-23 Δ C8 : mV-S23 Δ C8）を作製して用いた（図 3-1-1-2）。これらを用いることで細胞内の局在の変化など動的観察が可能となる。

はじめに、これらの融合タンパク質とコントロールとして mVenus（mV）を安定発現するマクロファージ細胞株を樹立しそれぞれの機能解析を行った。

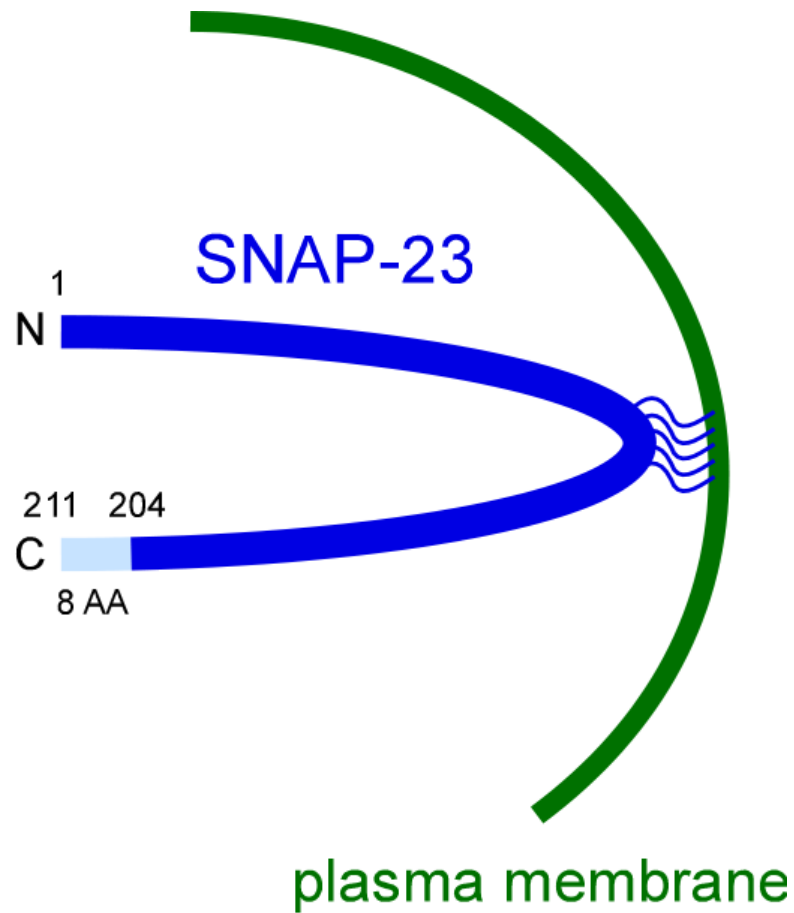
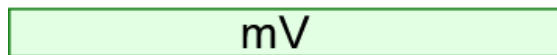


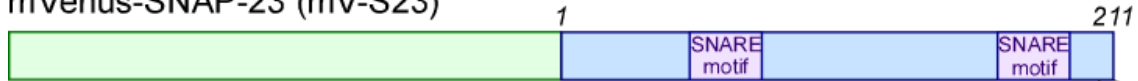
図 3-1-1-1. SNAP-23 の模式図

SNAP-23 は細胞膜局在の SNARE タンパク質である。膜貫通領域がなく、分子内にある五つのシステイン残基に脂質修飾を受けて細胞膜に結合している。SNAP-23 の C 末端 8 アミノ酸を欠失させるとエキソサイトーシスが阻害される。

mVenus (mV)



mVenus-SNAP-23 (mV-S23)



mVenus-SNAP-23 Δ C8 (mV-S23 Δ C8)

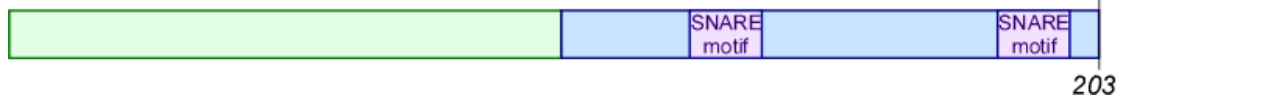


図 3-1-1-2. 黄色蛍光タンパク質（mVenus）の付加

mVenus は緑色蛍光タンパク質である GFP の誘導体である。これを SNAP-23, SNAP-23 Δ C8 の N 末端に付加し、融合タンパク質として安定発現するマクロファージを樹立した。これにより SNAP-23 の細胞内動態を可視化でき、過剰発現の効果を検証できる。SNAP-23 は、SNAP-25 ファミリーに属し構造的特徴として二つの Q-SNARE モチーフを持つ。

Western blot 法による mVenus 融合タンパク質の発現確認

mVenus 融合タンパク質はレトロウイルスを用いてマクロファージ (J774 細胞) へ導入し、puromycin 耐性を指標に安定発現株を樹立した。それぞれ、J774/mV, J774/mV-S23, J774/mV-S23ΔC8 と呼ぶことにした。これらの細胞株でのタンパク質の発現量 (状態) を確認するために、それぞれの細胞抽出液について Western blot 法により解析した (図 3-1-1-3)。

mVenus タンパク質を認識する抗 EGFP 抗体で調べた結果、約 25 kDa の位置に mV、約 50 kDa 付近に mV-S23 と mV-S23ΔC8 の発現がシングルバンドとして確認できた。また、抗 SNAP-23 抗体を用いて約 25 kDa の内在性 SNAP-23 と比べると、融合タンパク質は約 1.0~1.5 倍程度の発現量であることがわかった。次に、これら安定発現マクロファージを樹立する過程で、内在性タンパク質の発現に影響を及ぼしていないかを検証した。

その結果、内在性タンパク質のコントロールである GAPDH では、それぞれの細胞株間でほぼ同程度だった。ファゴサイトーシスにおいて IgG を認識する Fc 受容体の一つである CD64 (FcγRI) と細胞膜に局在する SNARE タンパク質の一つ syntaxin4 (syx4) についてそれぞれの特異的抗体を用いて調べた結果、発現量に大きな差は見られなかった。これらの結果から、他の内在性タンパク質の発現に影響することなく目的の mVenus 融合タンパク質の安定発現が確認できた。

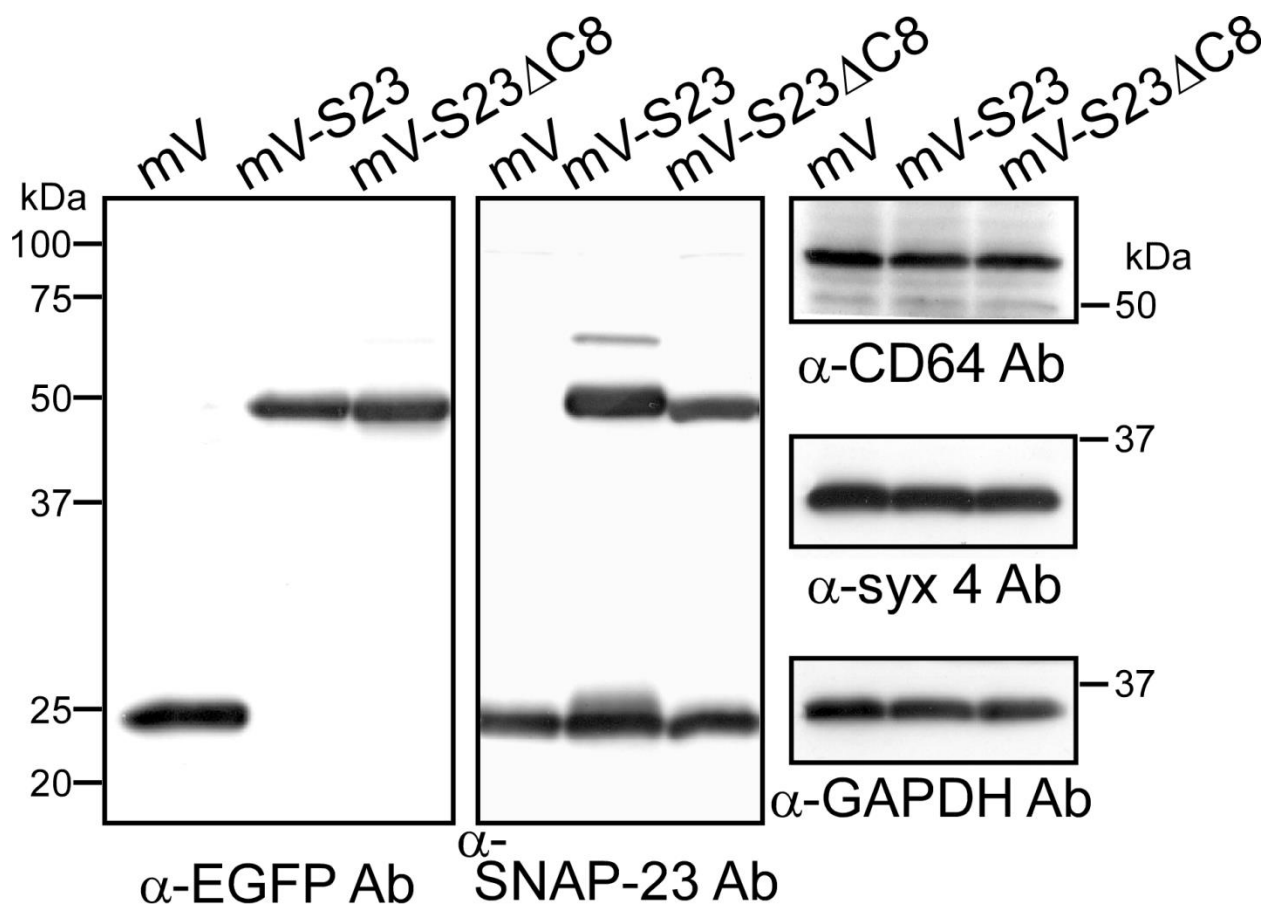


図 3-1-1-3. Western blot 解析による発現確認

- (左) 抗 EGFP 抗体による mVenus 融合タンパク質の確認。約 25 kDa の位置に mV の発現が、約 50 kDa の位置に mV-S23, mV-S23ΔC8 の発現が確認できた。
- (中) 抗 SNAP-23 抗体により、内在性の SNAP-23 (約 25 kDa) と発現させた mV-S23, mV-S23ΔC8 (約 50 kDa) が確認できた。
- (右) CD64, syntaxin4 (syx4), GAPDH の発現を調べたところ、どれも同程度の発現量で mVenus 融合タンパク質の過剰発現による影響は見られなかった。

顕微鏡観察による mVenus 融合タンパク質の細胞内局在の確認

mVenus 融合タンパク質の安定発現株における mV-S23 と mV-S23 Δ C8 の細胞内局在を共焦点顕微鏡により検証した（図 3-1-1-5）。それぞれの細胞を生きたままの状態を観察したところ、mV-S23 と mV-S23 Δ C8 はともに細胞膜上に強く、また内部のエンドソーム様の構造体にも弱い発現（局在）が確認できた。内部の局在は mV-S23 の方がより顕著に観察された。これらの局在は、内在性 SNAP-23 の局在（図 3-1-1-4）とよく一致することから、J774 細胞で過剰発現させた mVenus 融合タンパク質が異常な局在化をしていないことが確認できた。

また、作製した細胞におけるファゴサイトーシス時の mVenus 融合タンパク質の局在変化を調べるために、赤色蛍光色素（Texas Red）で標識した酵母の細胞壁粗画分（ザイモサン）を細胞に与え、時間を追ってその様子を観察した（図 3-1-1-6, 図 3-1-1-7）。さらに、より詳細にファゴソーム膜上への局在化を確認するため、IgG でオプソニン化したラテックスビーズ（直径 3.0 μ m）が細胞内に取り込まれた様子を超解像顕微鏡を用いて三次元構築した（図 3-1-1-8）。

いずれも明確にファゴソーム膜上に局在する様子が観察されたことから、SNAP-23 がファゴサイトーシスにおける膜融合反応のある段階で機能している可能性が考えられた。そこで、これら mVenus 融合タンパク質の安定発現マクロファージを用いてファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の機能解析を行った。

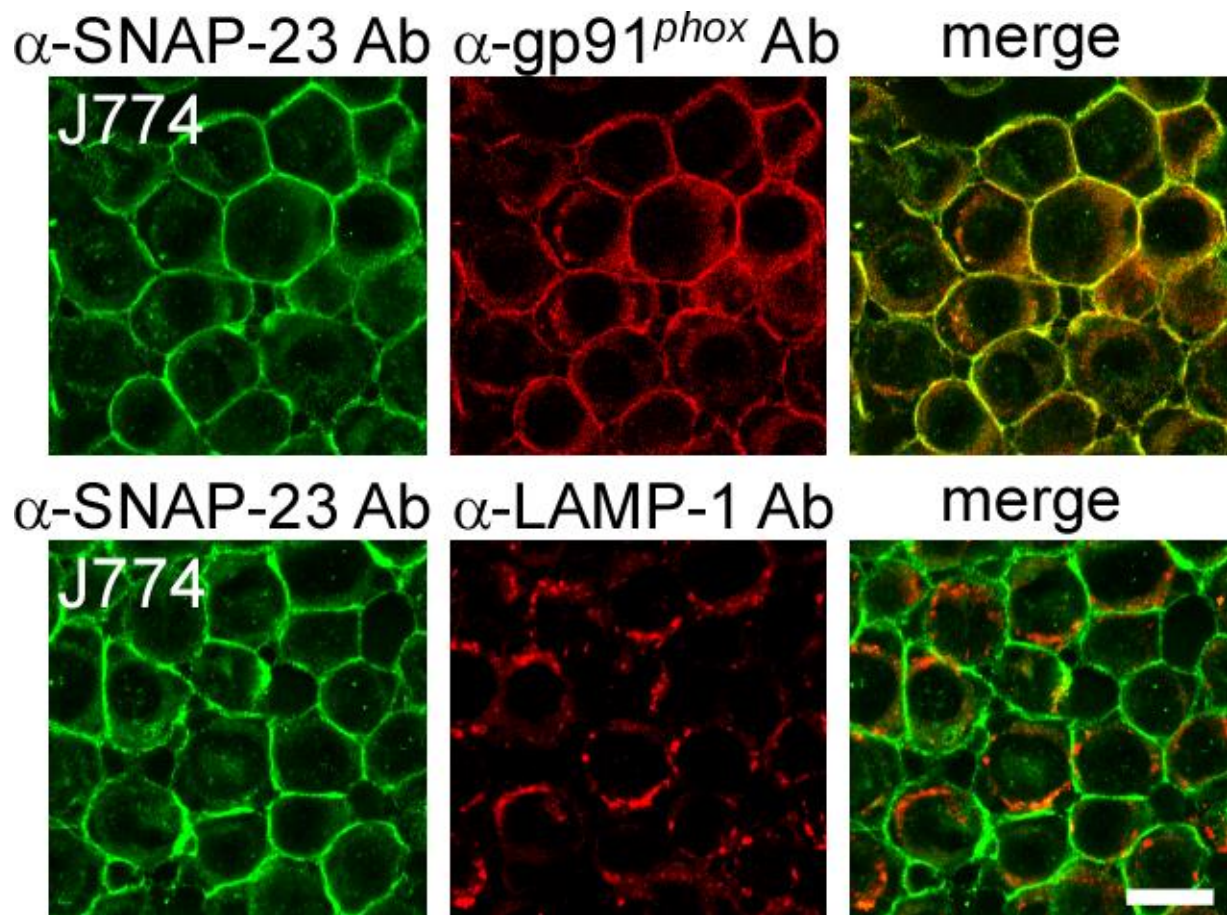
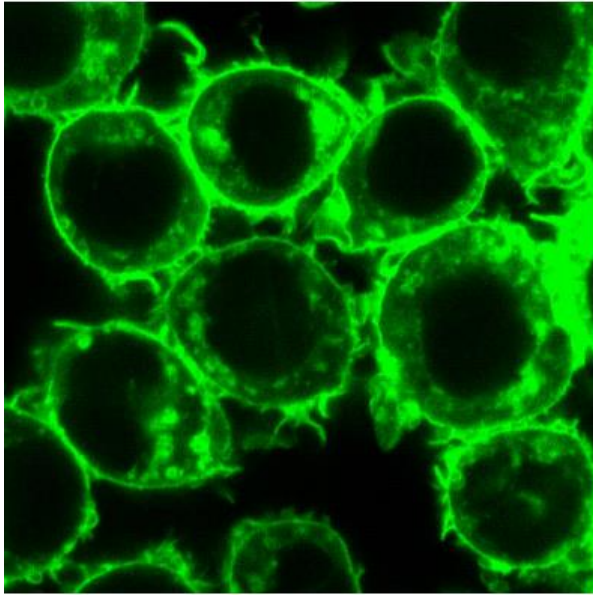


図 3-1-1-4. 内在性 SNAP-23 の細胞内局在

J774 細胞を抗 SNAP-23 抗体と Alexa 488 標識二次抗体および抗 gp91^{phox} 抗体と Alexa 594 標識二次抗体、抗 LAMP-1 抗体と Alexa 594 標識二次抗体により免疫染色し、共焦点顕微鏡により観察した。gp91^{phox} は細胞膜局在、LAMP-1 はライソゾーム局在のタンパク質である。Bar, 10 μ m

J774/mVenus-SNAP-23



J774/mVenus-SNAP-23 Δ C8

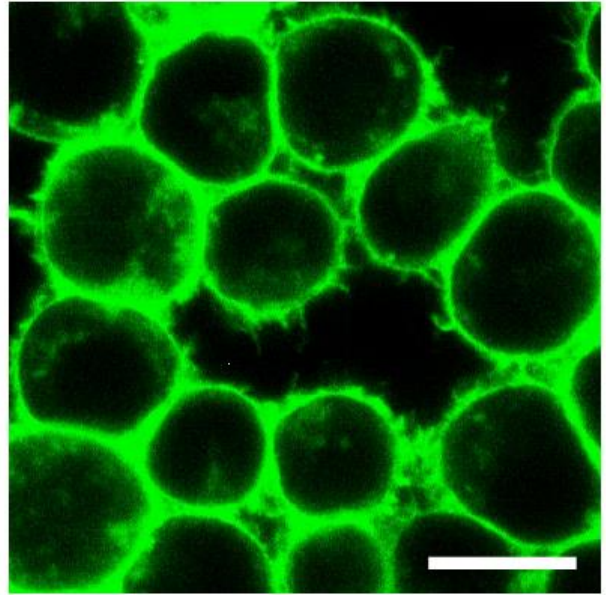


図 3-1-1-5. mVenus 融合タンパク質の細胞内局在

共焦点顕微鏡による mV-S23 細胞, mV-S23 Δ C8 細胞の写真。それぞれの mVenus 融合タンパク質は細胞膜上に強い発現が見られた。mV-S23 では内部のオルガネラにも観察された。Bar, 10 μ m

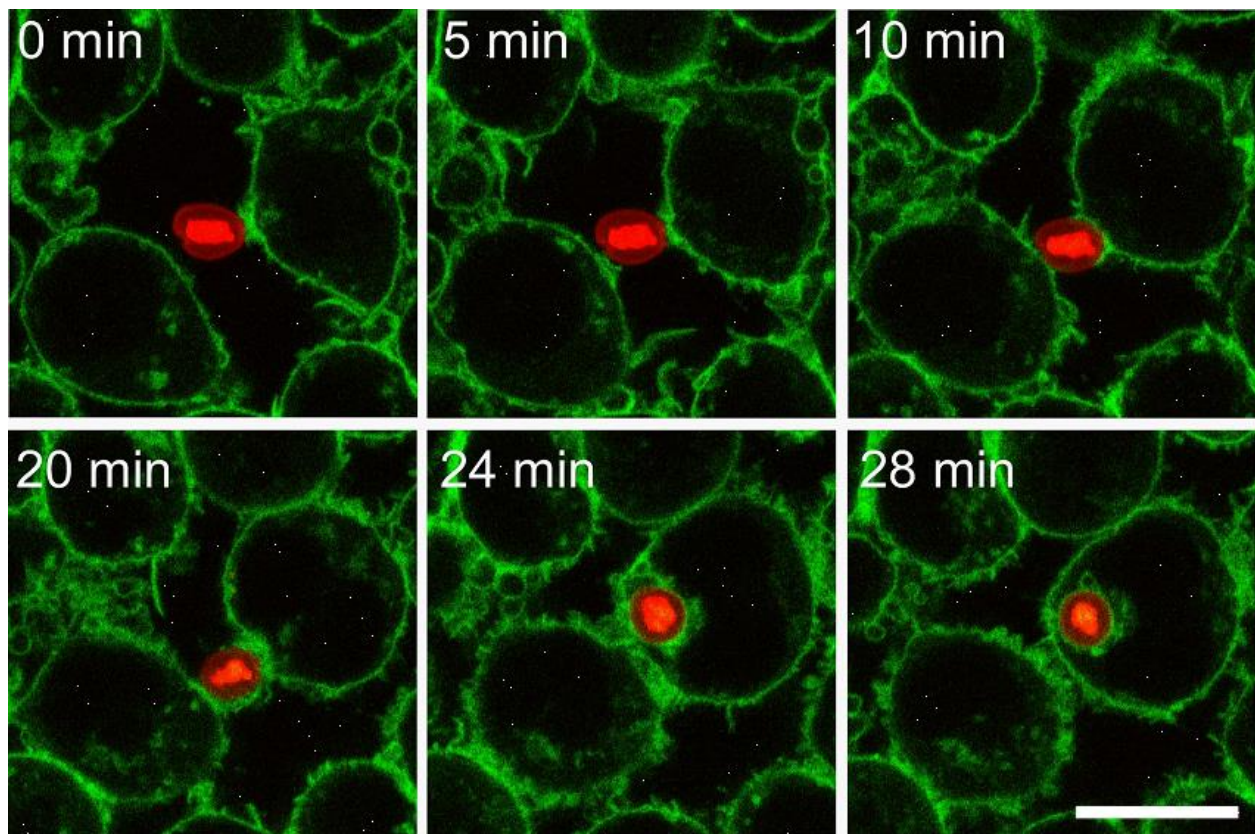


図 3-1-1-6. ザイモサンの細胞内への取り込み (1)

mV-S23 細胞に Texas Red 標識したザイモサンを与え、時間を追って観察した共焦点顕微鏡写真。取り込みにともなって細胞膜からファゴソーム膜上に SNAP-23 が局在化する様子が観察された。Bar, 10 μ m

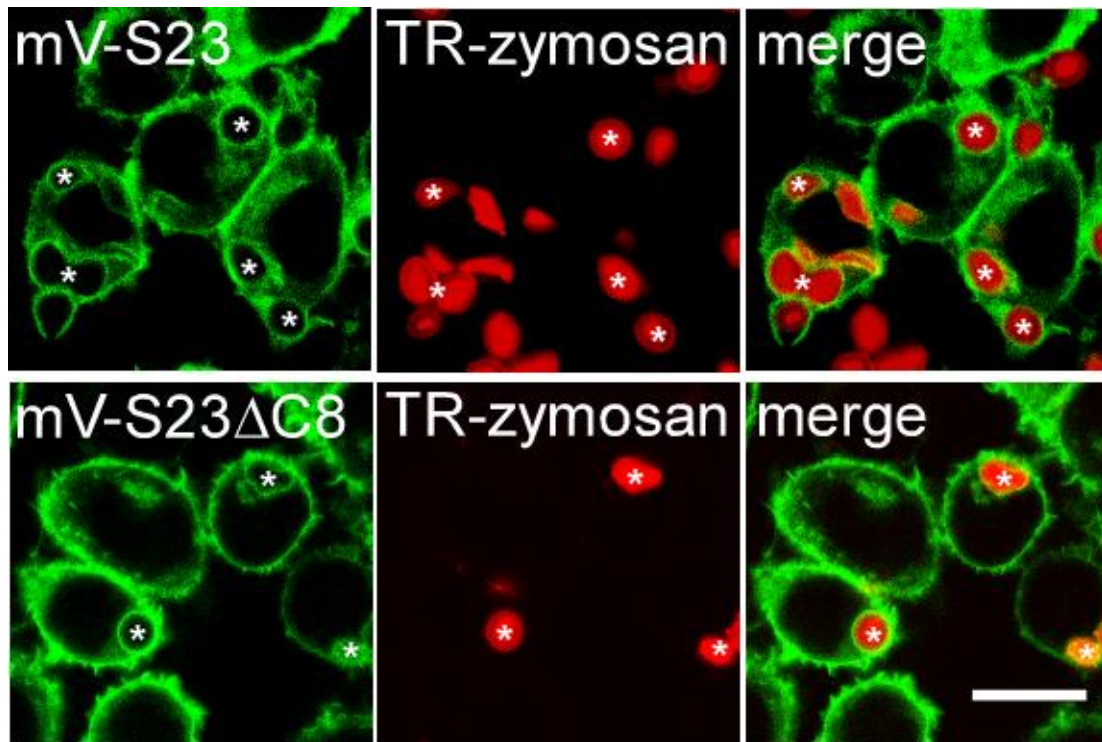


図 3-1-1-7. ザイモサンの細胞内への取り込み (2)

mV-S23 細胞と mV-S23ΔC8 細胞に Texas Red 標識ザイモサン (TR-zymosan) をファゴサイトーシスさせてから 30 分後に撮影した共焦点顕微鏡写真。mV-S23, mV-S23ΔC8 とともにファゴソーム膜上への局在化が見られた。Bar, 10 μ m

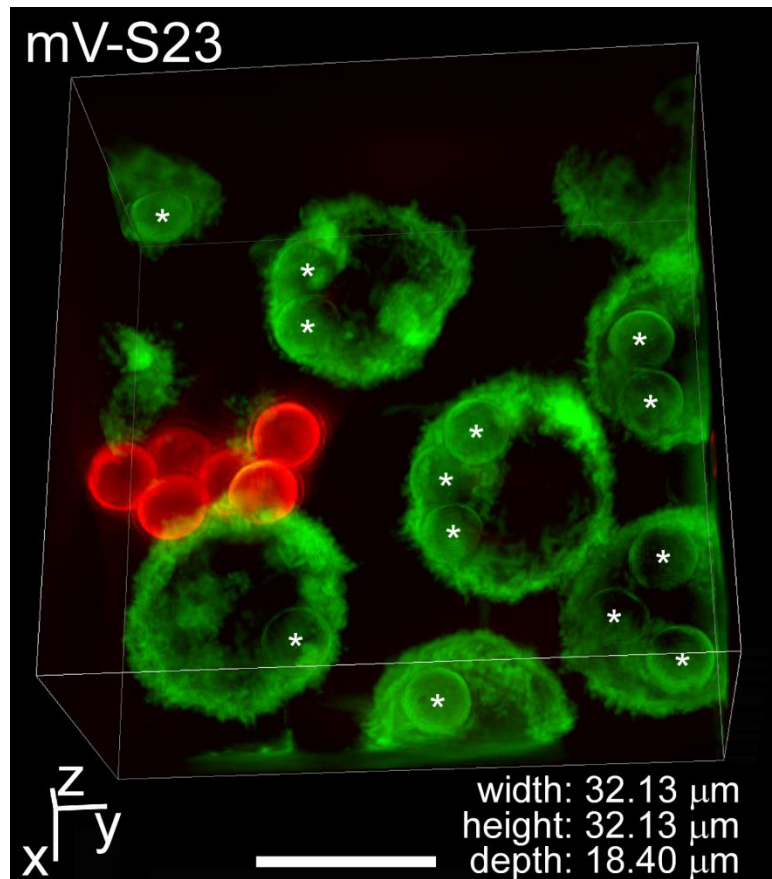


図 3-1-1-8. ラテックスビーズの細胞内への取り込み

mV-S23 細胞に IgG でオプソニン化したラテックスビーズ（直径 3.0 μm ）をファゴサイトーシスさせてから 30 分後に固定し超解像顕微鏡で撮影した三次元構築写真。ラテックスビーズをファゴサイトーシスさせた後に、細胞外のラテックスビーズのみを Alexa 594 標識二次抗体で染色した。取り込まれたラテックスビーズ表面（ファゴソーム膜）には mV-S23 が局在している様子が観察された（*）。Bar, 10 μm

3.1.2 SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの形成過程へ及ぼす影響についての検証 [1]

ファゴサイトーシス効率に変化はなかった (OFZ を用いた検討)

作製した mVenus 融合タンパク質発現細胞株を用いてファゴサイトーシス効率を検証するために、IgG でオプソニン化した蛍光 (FITC) 標識ザイモサン (Opsonized FITC-zymosan : OFZ) を用いた解析を行った。この OFZ を細胞に与え、1 時間経過後に細胞外の OFZ をトリパンブルー溶液で消光し、取り込まれた OFZ のみを測定した (図 3-1-2-1)。

その結果、mVenus 融合タンパク質発現細胞間では、OFZ のファゴサイトーシス効率に有意な差は見られなかった (図 3-1-2-2 : 下)。また、OFZ と細胞膜との接触効率に関してもいずれも同程度であった (図 3-1-2-2 : 上)。

以上の結果から、マクロファージにおける SNAP-23 の過剰発現は、ファゴサイトーシスにおける取り込み効率へは影響しないと考えられた。

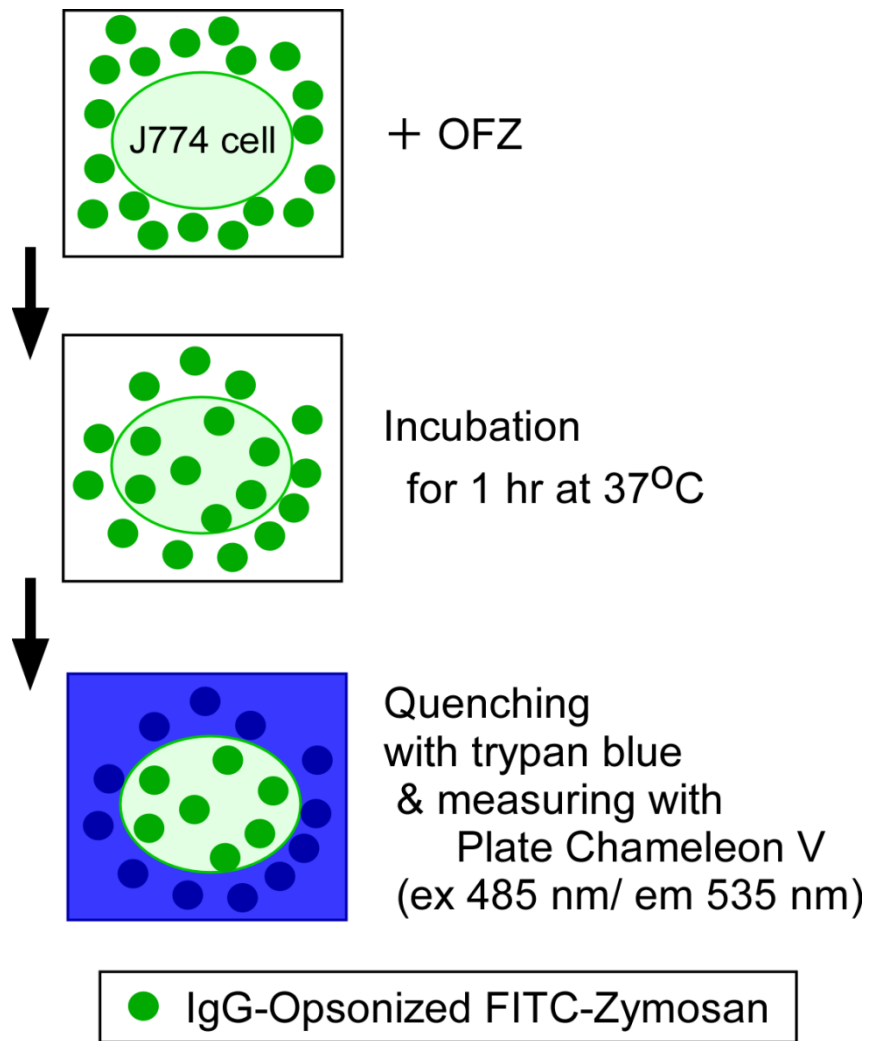


図 3-1-2-1. OFZ を用いたファゴサイトーシス効率測定の概略

細胞にオプソニン化した FITC 標識ザイモサン (OFZ) を与えて 37°C で 1 時間培養し、取り込ませた。細胞外の OFZ はトリパンプブルー溶液を加えることで消光でき、取り込まれた OFZ の蛍光強度のみをプレートリーダーで測定した。

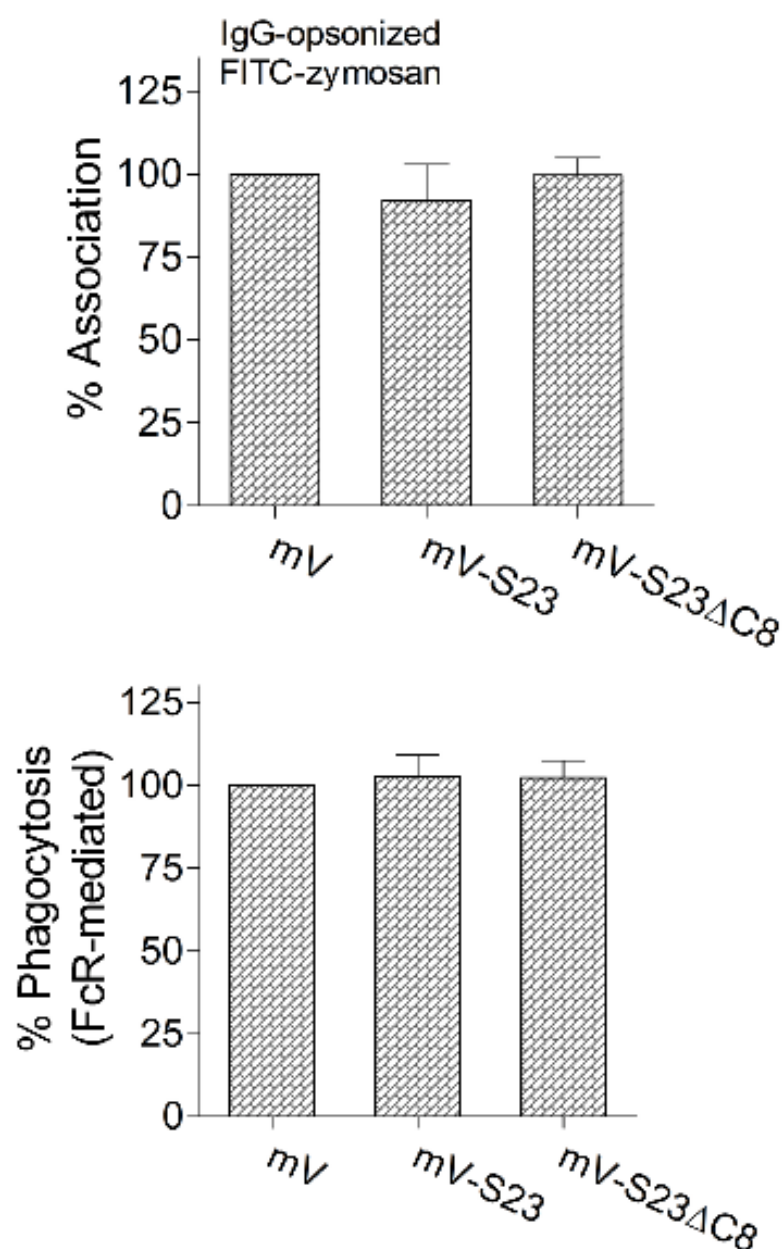


図 3-1-2-2. OFZ を用いたファゴサイトーシス効率の測定

- (上) OFZ と細胞膜との接触効率に差はなかった。
- (下) mV 細胞における OFZ の取り込み量を 100% として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。どの細胞も同程度のファゴサイトーシス効率だった。つまり、mV-S23 や mV-S23ΔC8 の過剰発現はファゴサイトーシスにおける取り込み量（効率）には影響しないことがわかった。

細胞外への活性酸素種の放出は亢進した

前述のように、mV-S23 や mV-S23ΔC8 の過剰発現によるファゴサイトーシス効率への影響は見られなかった（図 3-1-2-2）ため、SNAP-23 は J774 細胞において機能していない可能性が考えられた。そこで次に、細胞外への ROS の放出について検討した。

食細胞では、ホルボールエステル的一种である PMA の刺激によって NOX2 複合体が細胞膜上に形成される^[33]。NOX2 複合体は、細胞膜局在の gp91^{phox} と p22^{phox} に細胞質局在因子（p47^{phox}, p67^{phox}, Rac）が結合することで形成し活性化され、細胞外に ROS が放出される。一般的には、PMA 刺激で急激に ROS の放出量が上昇し、その後は緩やかに減少する様子が観察される。

本実験では、培地中にルミノール基質を混和し培養することにより、細胞外に放出された ROS を化学発光としてモニターした。ルミノメーターで測定開始 5 分後に PMA を加え細胞外へ放出された ROS を測定すると、mV-S23 細胞（●）では、コントロールである mV 細胞（○）に比べて約 6 倍に上昇していた。また、mV-S23ΔC8 細胞（□）では、ROS の放出はほとんど阻害されていた（図 3-1-2-3）。このことから、SNAP-23 の C 末端部分は細胞膜上での膜融合、つまり、NOX2 複合体の細胞質局在因子のエキソサイトーシスにおいて重要な機能を果たす可能性が考えられた。

また、この結果が NOX2 複合体の形成因子や他の SNARE タンパク質の発現量の差による影響でないことを確認するため、Western blot 解析を行った。その結果、調べた限りのタンパク質において発現量の違いは見られなかった（図 3-1-2-4）。

以上の結果から、J774 細胞において SNAP-23 は、細胞膜上における ROS の産生に関与していることが明らかになった。おそらく、NOX2 複合体は小胞輸送系を介して形成・活性化され、その過程における膜融合反応に SNAP-23 が関与している可能性が考えられる。

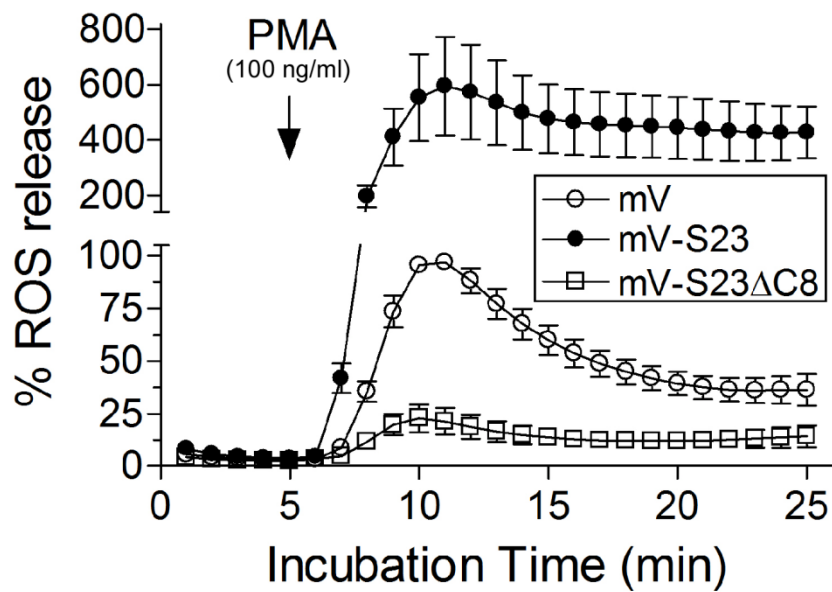


図 3-1-2-3. PMA 刺激時の ROS 放出量の測定

細胞にルミノール基質を加え 5 分後に PMA 刺激を与え細胞外へ放出される ROS を測定した。ルミノール基質との反応で発生する化学発光量 (relative light units : RLUs) をモニターし産生された ROS の放出量を測定した。ROS 放出量は PMA 刺激後 5～6 分で最大となり、その後ゆるやかに減少した。mV-S23 細胞 (●) では mV 細胞 (○) に比べて約 6 倍の ROS の産生が観察され、一方、mV-S23ΔC8 細胞 (□) ではその産生に阻害が見られた。

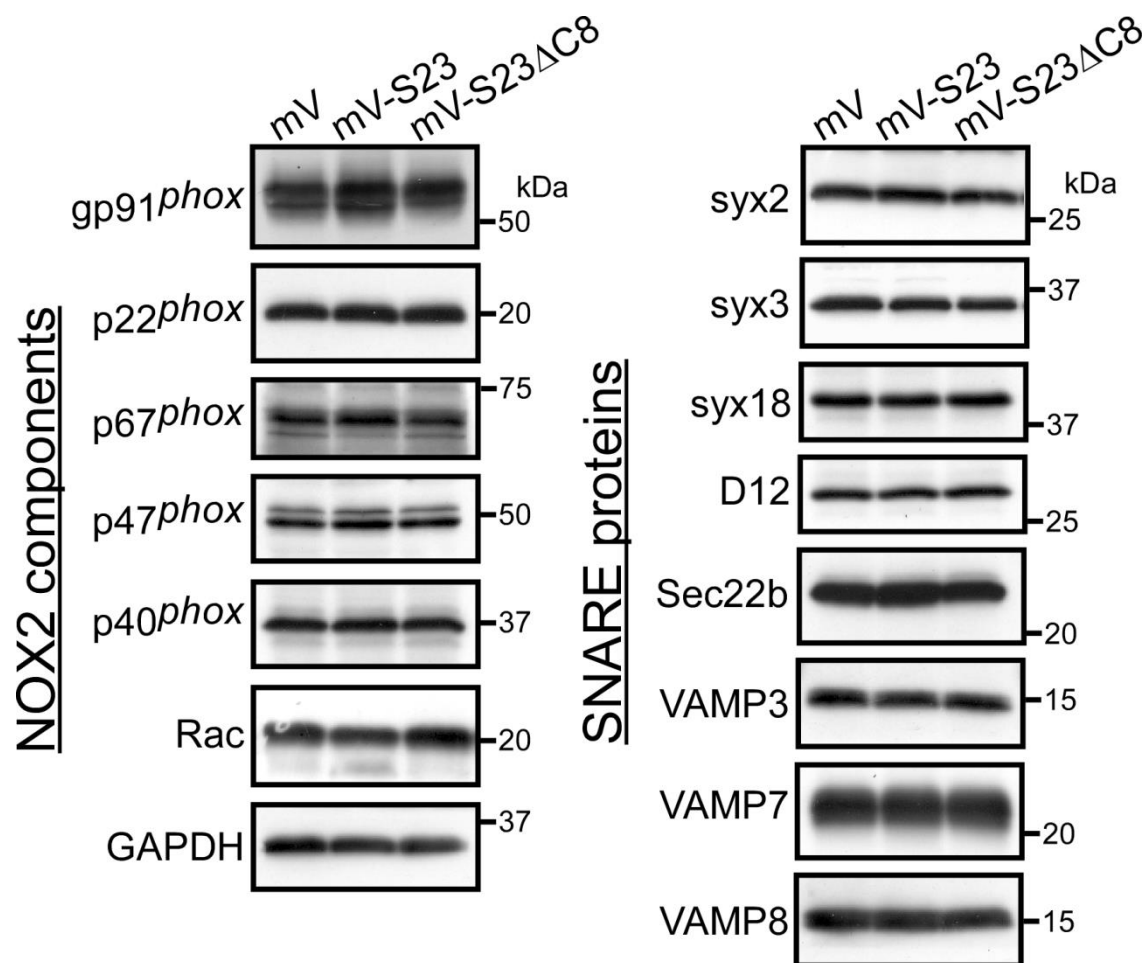


図 3-1-2-4. Western blot 解析による発現確認

- (左) mV 細胞, mV-S23 細胞, mV-S23ΔC8 細胞において NOX2 複合体形成因子の発現量に差は見られなかった。
- (右) mV 細胞, mV-S23 細胞, mV-S23ΔC8 細胞においてファゴサイトーシスへの関連が報告されている SNARE タンパク質の発現量を調べたところ、どれも同程度だった。

3.1.3 SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの成熟過程へ及ぼす影響についての検証

ファゴソーム内部の活性酸素種の産生は亢進した

マクロファージにおけるファゴソームの成熟過程は、①異物の殺菌に関わる ROS を産生する NOX2 複合体の形成と活性化（初期に起こる）、②内部の酸性化と加水分解酵素の集合、③抗原提示複合体の形成と抗原提示、などの段階を経て進行する。これまでの結果で mV-S23 の過剰発現による異物の取り込み量に対する影響は見られなかった（図 3-1-2-2）が、細胞外への ROS の放出量は増加していた（図 3-1-2-3）ことから、SNAP-23 が①の過程で見られるファゴソーム内部への ROS 産生について何らかの影響を及ぼす可能性が考えられ、次にファゴソーム内部に産生される ROS について解析を行った。

異物を取り込んだファゴソーム膜上には、ファゴソーム内部に ROS を産生する分子群（NOX2 複合体）が集合して活性化される^[34]。このときに産生される ROS と反応して化学発光するビーズ（ルミノールビーズ）を用いて、mVenus 融合タンパク質発現細胞におけるファゴソーム内部への ROS 産生量を検討した（図 3-1-3-1）。

この結果、mV-S23 細胞（○）では、コントロールである mV 細胞（●）に比べてルミノールビーズの活性化は約 4 倍に上昇していた。アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン B（cyto B）が存在するとファゴサイトーシスが抑制されるが、その条件ではそれらの反応は全く見られなかった（▼，△）。mV-S23ΔC8 細胞では、コントロールに比べ非常に僅かではあるがファゴソーム内部への ROS の産生は抑制されていた（□）（図 3-1-3-2）。

使用したルミノールビーズは IgG でオプソニン化していないので、ここで検出した ROS 産生量は Fc 受容体（FcR）に依存しない取り込みの結果によるものと考えられる。しかし、図 3-1-2-2 の結果は IgG でオプソニン化したザイモサンに対する FcR 依存的な

ファゴサイトーシス効率を測定したものであるため、ルミノールビーズを用いたこの結果は取り込み量の差を反映している可能性が考えられた。そこで、オプソニン化していない FITC 結合ビーズを用いて FcR 非依存的なファゴサイトーシス効率の測定を行ったところ、やはり、mVenus 融合タンパク質発現細胞間で差は見られなかった(図 3-1-3-3)。

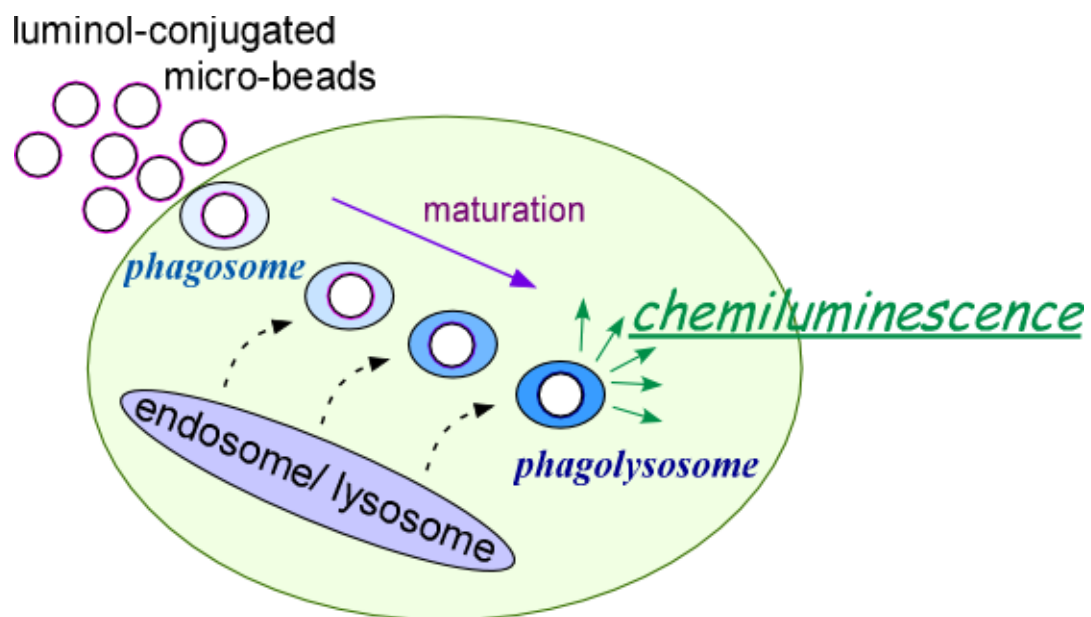


図 3-1-3-1. ルミノールビーズを用いたファゴソーム内部の ROS 産生量測定の概略

ファゴサイトーシスにより取り込まれたルミノールビーズは、ファゴソーム成熟にともない内部に産生される活性酸素と反応して化学発光する。この化学発光量を測定することで、ファゴソーム内部に産生される ROS の量を調べた。

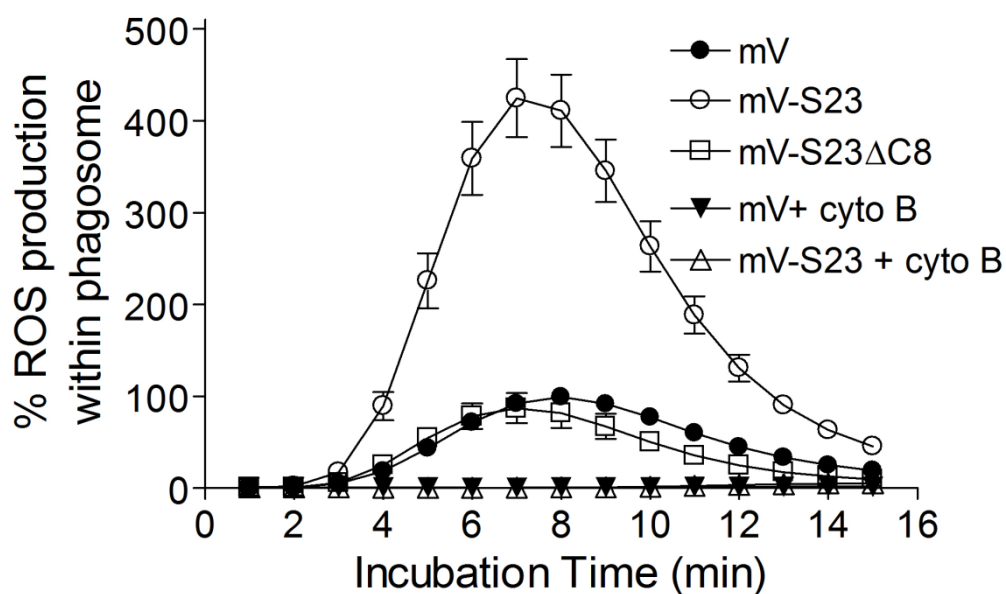


図 3-1-3-2. ルミノールビーズを用いたファゴソーム内部に産生される ROS の測定

測定は 15 分間行ったが、開始後 3～4 分で化学発光が検出され 7～8 分で最大となった。得られた値は、mV 細胞（コントロール）の最大値を 100%として他の値を標準化した。mV-S23 細胞（○）では mV 細胞（●）に比べて約 4 倍の ROS の産生が見られた。mV-S23ΔC8 細胞（□）では mV 細胞に比べて僅かながらファゴサイトーシスの抑制が見られた。アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン B（cyto B）が存在する場合、化学発光は検出されなかった（▼，△）。

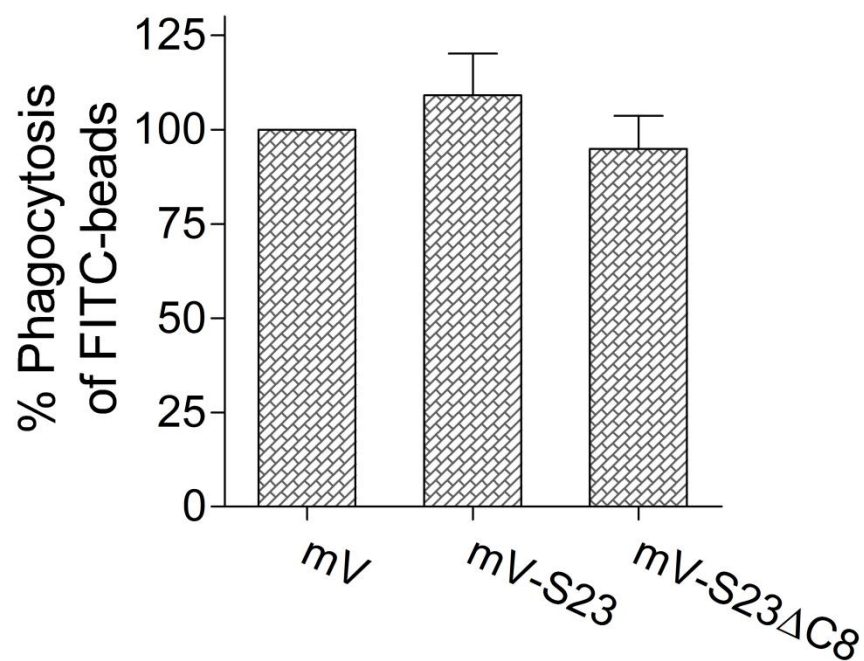


図 3-1-3-3. FITC 結合ビーズによるファゴサイトーシス効率の測定

mV 細胞における FITC 結合ビーズの取り込み量を 100%として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。どの細胞も同程度のファゴサイトーシス効率だった。

ファゴソーム内部の酸性化は亢進した（pHrodo-*S. aureus* を用いた検討）

先述したように、ファゴソームの成熟過程においては ROS の産生の後に酸性化が起こる。ファゴソーム内部への ROS の産生については mV-S23 の過剰発現により亢進した（図 3-1-3-2）ので、次に酸性化の過程への影響について検証した。

ファゴソーム内部は、エンドソームやライソゾームに局在する V-ATPase がファゴソームに輸送されることによって酸性化される。そこで、ファゴソーム内部の酸性化状態を可視化および定量化するために、pHrodo 標識黄色ブドウ球菌（pHrodo -*Staphylococcus aureus* : pHrodo-*S. aureus*）を使用した。pHrodo-*S. aureus* は中性環境では蛍光を発しないが酸性環境下で赤色蛍光を発するので、ファゴソーム内に取り込まれてからの酸性化状態を検出できる（図 3-1-3-4）。これを mVenus 融合タンパク質発現細胞に取り込ませ、ファゴソーム内部の酸性化状態をモニターし mV-S23 の過剰発現の影響を検証した。

はじめに、pHrodo-*S. aureus* の取り込みとファゴソーム内での発光の様子を確認した（図 3-1-3-5）。黄色ブドウ球菌は、通常マクロファージが細胞表面に発現している Toll 様受容体 (TLR2) によってファゴサイトーシスされる。しかし、これまでの実験では IgG でオプソニン化したザイモサンを用いて FcR 依存的なファゴサイトーシスを解析してきたので、本実験では抗黄色ブドウ球菌抗体で pHrodo-*S. aureus* をオプソニン化したものを使用した。加えた直後（0 min）でも赤色蛍光を発しているものが少量見られたが、培養を続けることで、細胞内部に蛍光強度の顕著な増加が観察された。そこで、次にオプソニン化 pHrodo-*S. aureus* を加えてからの経過時間ごとの蛍光強度を定量した（図 3-1-3-6）。

その結果、mV-S23 細胞では mV 細胞に比べて赤色蛍光量が多く、ファゴソーム内部の酸性化が亢進していることがわかった。一方、mV-S23ΔC8 細胞は、mV 細胞に比べるとファゴソームの酸性化が若干遅れるという結果になった。測定開始直後の 0 分の段階では mV-S23 細胞が mV 細胞に比べて低い結果になっているが、これはファゴソーム内部に産生した活性酸素の影響によると考えられる。先に行ったルミノールビーズを用い

た ROS 産生の結果（図 3-1-3-2）より、SNAP-23 を過剰発現させた細胞では mV 細胞に比べて活性酸素の産生量が亢進することがわかっている。つまり、このファゴソーム内に産生した活性酸素がプロトンと結合し消費されてしまうために、mV-S23 細胞では初期の段階で酸性化が減弱したと考えられる。

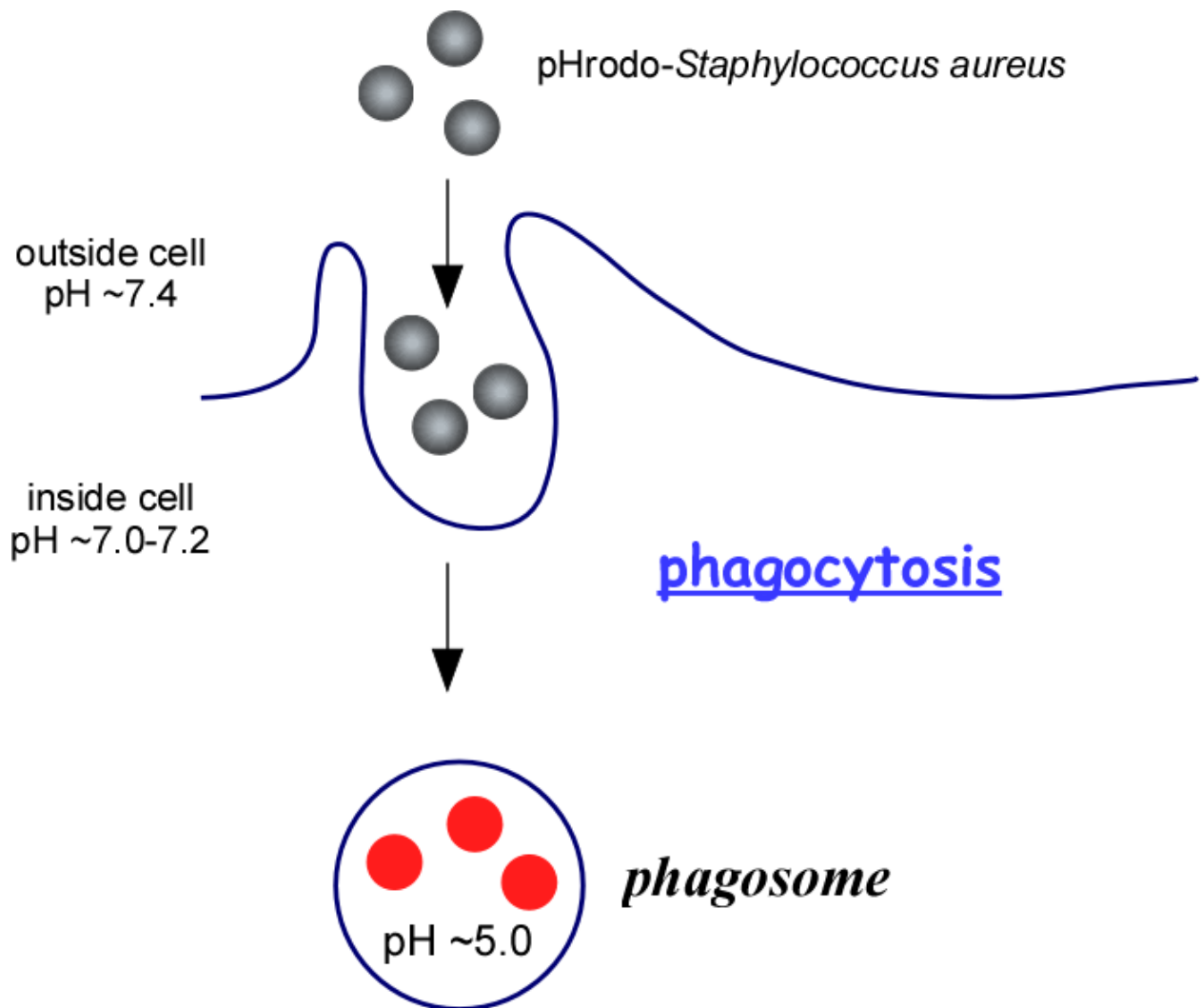


図 3-1-3-4. *pHrodo-S. aureus* を用いたファゴソーム内部酸性化の測定法の概略

pHrodo-S. aureus は酸性環境下で赤色蛍光を発する。ファゴサイトーシスによって形成されたファゴソームは、成熟にともなって内部環境が酸性化する。*pHrodo-S. aureus* を取り込ませることによって、内部の酸性化の程度（ファゴソームの成熟）を蛍光強度により測定した。

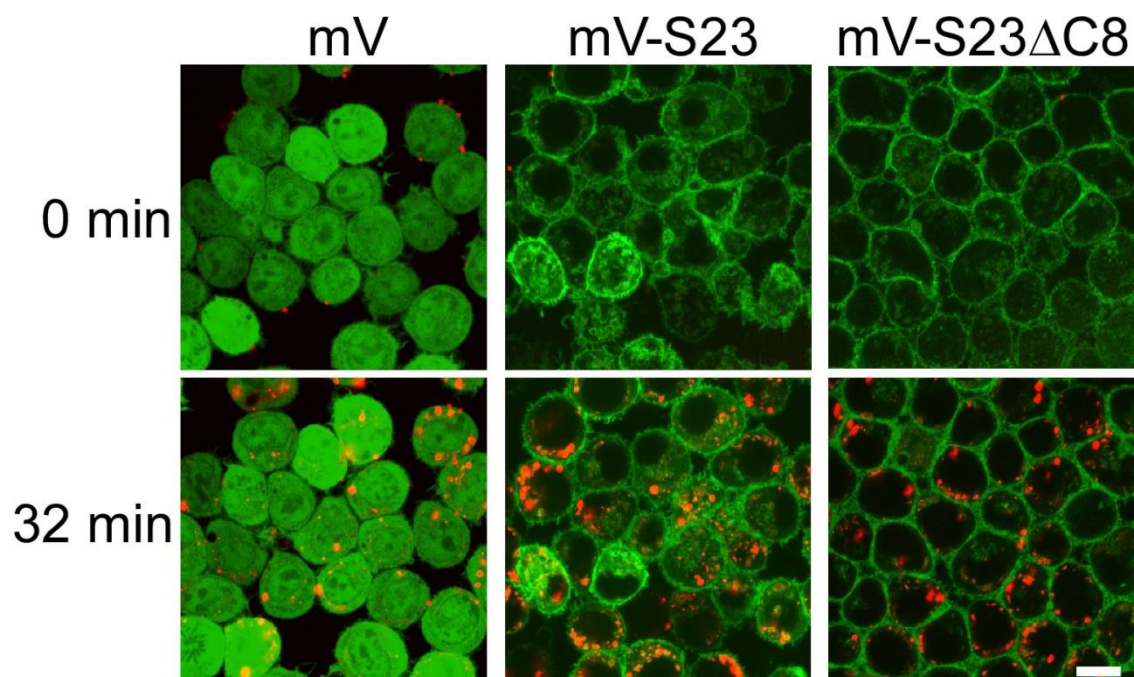


図 3-1-3-5. pHrodo-*S. aureus* の細胞内への取り込みとファゴソーム内での赤色発光

mV, mV-S23, mV-S23ΔC8 のそれぞれの安定発現株に pHrodo-*S. aureus* を与え、その直後と 32 分後の共焦点顕微鏡写真。細胞外環境（中性）ではほとんど蛍光は観察できなかった（上：0 min）。ファゴソームの酸性化にともなって、取り込まれた pHrodo-*S. aureus* が赤色蛍光を発することが確認できた（下：32 min）。Bar, 10 μ m

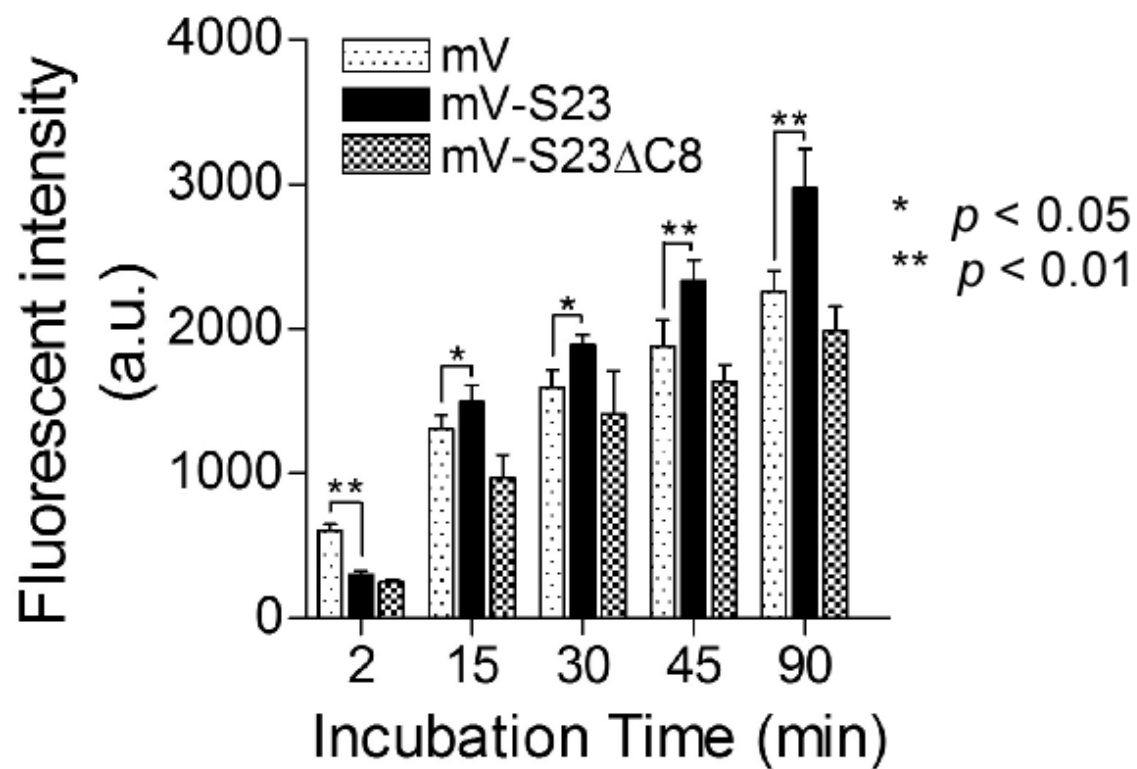


図 3-1-3-6. pHrodo-*S. aureus* を用いたファゴソーム酸性化の測定

pHrodo-*S. aureus* を細胞に与えて、それぞれの時間で蛍光強度を定量した。mV 細胞に比べて mV-S23 細胞では蛍光強度が強くファゴソーム内部の酸性化の亢進が見られたが、mV-S23 Δ C8 細胞では僅かな阻害が見られた。

ファゴソーム内部の酸性化は亢進した（LysoTracker を用いた検討）

ファゴソーム内部の酸性化を確認するために、さらに細胞内の酸性物質を染色する赤色色素（LysoTracker Red DND-99 : LysoTracker）を用いた検討を行った。ファゴソームは、その成熟過程でライソゾームなどのオルガネラと融合を繰り返し、内部環境を酸性化しながら成熟する。LysoTracker はライソゾームを含む酸性オルガネラに蓄積するため、ファゴソーム内部の酸性化の進行を顕微鏡下で解析できる。そこで、予め LysoTracker で酸性オルガネラを染色した mVenus 融合タンパク質発現細胞にオプソニン化ビーズを取り込ませ、経過時間ごとの LysoTracker で染色されたファゴソームの割合を計測した（図 3-1-3-7, 図 3-1-3-8）。先の pHrodo-*S. aureus* を用いた方法では複数の細胞を総体として解析するため、ファゴサイトーシス効率の影響を受けるが、この LysoTracker を用いた方法ではシングルファゴソームを解析するためその影響は排除できる。

解析の結果、mV-S23 細胞では LysoTracker で染まっているファゴソームの割合がコントロールである mV 細胞に比べて高くなっていた（図 3-1-3-9 : 下）。つまり、mV-S23 の過剰発現によりファゴソーム内部の酸性化がより亢進することがわかった。一方、mV-S23ΔC8 細胞においては mV 細胞と同程度だった。なお、LysoTracker を用いた細胞内の酸性オルガネラの染色について、細胞株間で差はなかった（図 3-1-3-9 : 上）。また、本実験で用いた LysoTracker は酸性物質に蓄積する特徴を持つため、直接的にファゴソームに蓄積する可能性や、酸性オルガネラから一度解離してファゴソームに蓄積する可能性も考えられた（図 3-1-3-7）。

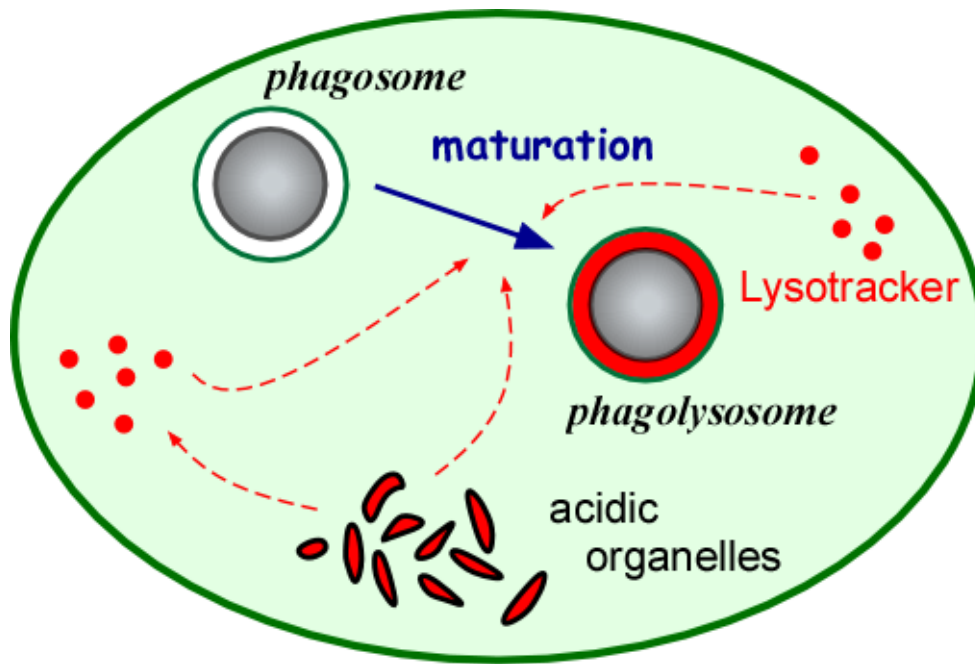


図 3-1-3-7. LysoTracker を用いたファゴソーム酸性化の測定法の概略

LysoTracker は酸性オルガネラを染色する。ファゴサイトーシスによって形成されたファゴソームは、成熟にともなって酸性オルガネラと融合し内部環境が酸性化する。細胞にファゴサイトーシスさせて形成したファゴソームについて、LysoTracker で染色されたファゴソームの割合を計測した。

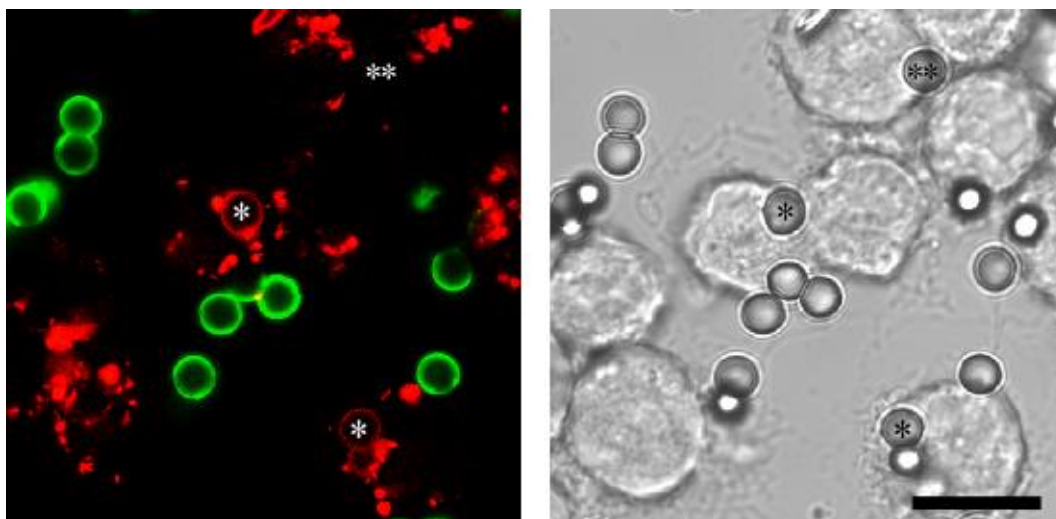


図 3-1-3-8. LysoTracker を用いたファゴソーム酸性化の測定の蛍光顕微鏡写真

LysoTracker は酸性オルガネラを染色する。ファゴサイトーシスによって形成されたファゴソームは、成熟にともなって酸性オルガネラと融合し内部環境が酸性化するため、LysoTracker で染色されたファゴソーム（*）が観察できる。**のファゴソームは、細胞内に取り込まれたが LysoTracker で染色されていないファゴソームである。また、緑色で染色されたビーズは、細胞内に取り込まれていないビーズである。Bar, 10 μm

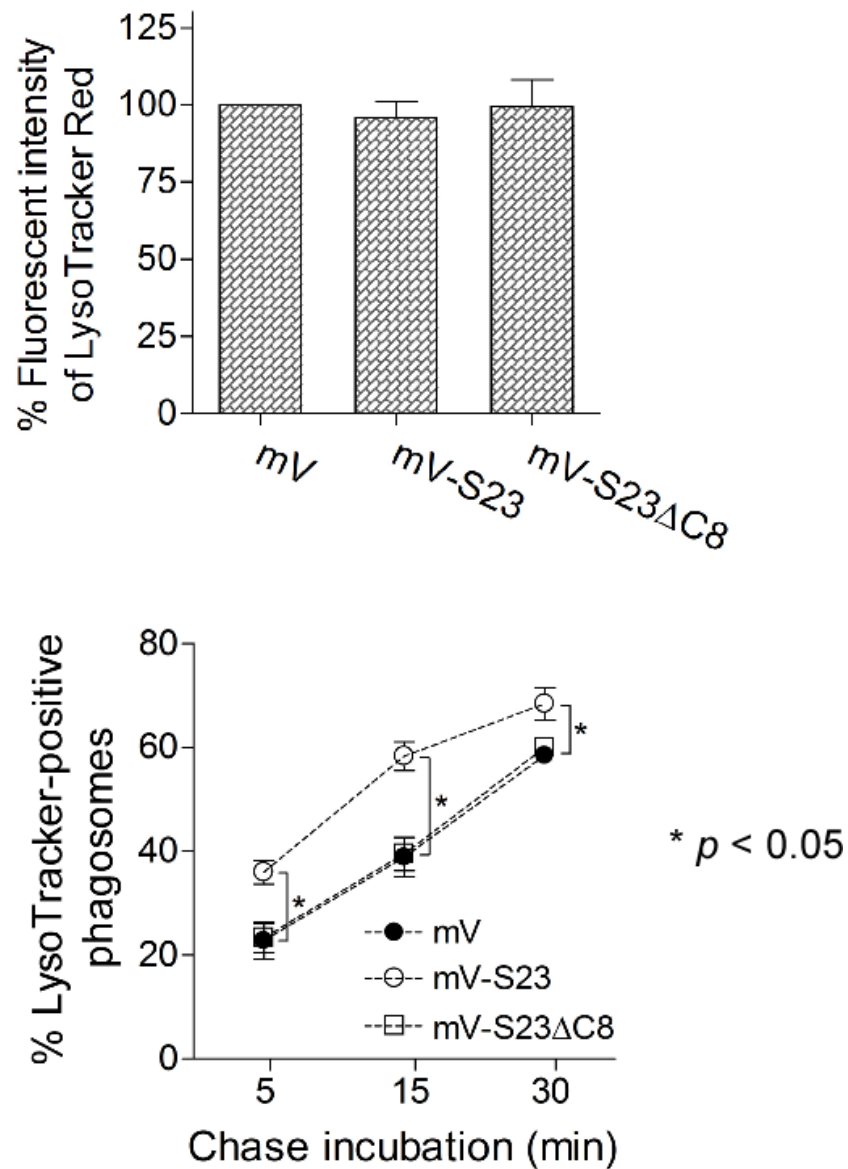


図 3-1-3-9. LysoTracker を用いたファゴソーム酸性化の測定

- (上) LysoTracker での細胞内酸性オルガネラの染色について差はなかった。
- (下) LysoTracker で染色した細胞にファゴサイトーシスさせて形成したファゴソームについて、LysoTracker で染色されているファゴソームの割合をそれぞれの時間で計測した。mV 細胞や mV-S23 Δ C8 細胞に比べて mV-S23 細胞では LysoTracker で染色されたファゴソームの割合が高く、ファゴソーム内部の酸性化が亢進していた。

3.1.4 SNAP-23 の過剰発現がファゴソームの形成過程へ及ぼす影響についての検証 [2]

ファゴサイトーシス効率は亢進した（OTRZ を用いた検討）

これまでの結果から、SNAP-23 の過剰発現によりファゴソーム内部の酸性化が亢進することがわかった（図 3-1-3-6, 図 3-1-3-9）。これまでのファゴサイトーシス効率の測定（図 3-1-2-2, 図 3-1-3-3）に用いた蛍光色素である FITC は酸性環境下で蛍光が減弱するため、ファゴソームの酸性化がより進んでいる mV-S23 細胞では、本来のファゴサイトーシス効率よりも低く評価している可能性が考えられた。そこで、酸性環境下においても蛍光強度に影響のない蛍光色素（Texas Red）で標識した IgG オブソニン化ザイモサン（Opsonized Texas Red-zymosan : OTRZ）を用いて、再度ファゴサイトーシス効率を測定した（図 3-1-4-1）。

その結果、mV-S23 細胞では mV 細胞と比較して 2 倍以上の取り込み量の増加が見られ、一方、mV-S23ΔC8 細胞は mV 細胞と同程度であった（図 3-1-4-2 : 下）。つまり、図 3-1-2-2 と図 3-1-3-3 の実験では、mV-S23 細胞におけるファゴソーム内部の酸性化の亢進によって FITC が消光し、結果として mV-S23 細胞での取り込み量が mV 細胞や mV-S23ΔC8 細胞と同程度のように見えたと考えられる。

また、mV 細胞と mV-S23 細胞について、取り込みの速度を調べるため OTRZ を細胞に加えてから時間経過ごとのファゴサイトーシス効率を測定したところ、mV-S23 細胞では mV 細胞に比べて早い段階（5 分）から効率の差が見られ、60 分経過後でもその差は維持されたままだった（図 3-1-4-3）。

ここまでの結果から、mV-S23 細胞はファゴソームの形成と成熟の過程を亢進することがわかった。

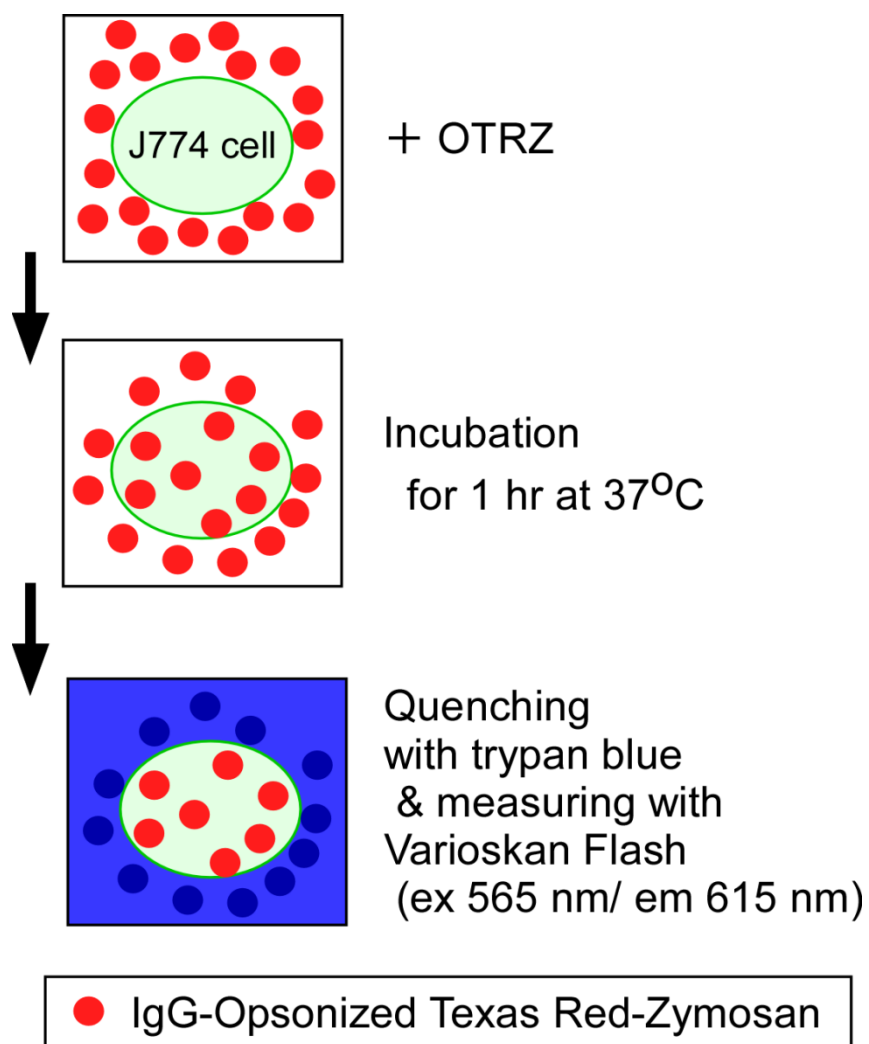


図 3-1-4-1. OTRZ を用いたファゴサイトーシス効率測定の概略

細胞にオプソニン化した Texas Red 標識ザイモサン（OTRZ）を与えて 37°C で 1 時間培養し、取り込ませた。細胞外の OTRZ はトリパンプルー溶液を加えることで消光でき、取り込まれた OTRZ の蛍光強度のみをプレートリーダーで測定した。これにより、ファゴソームの成熟化による影響は受けずに OTRZ の取り込みを計測できる。

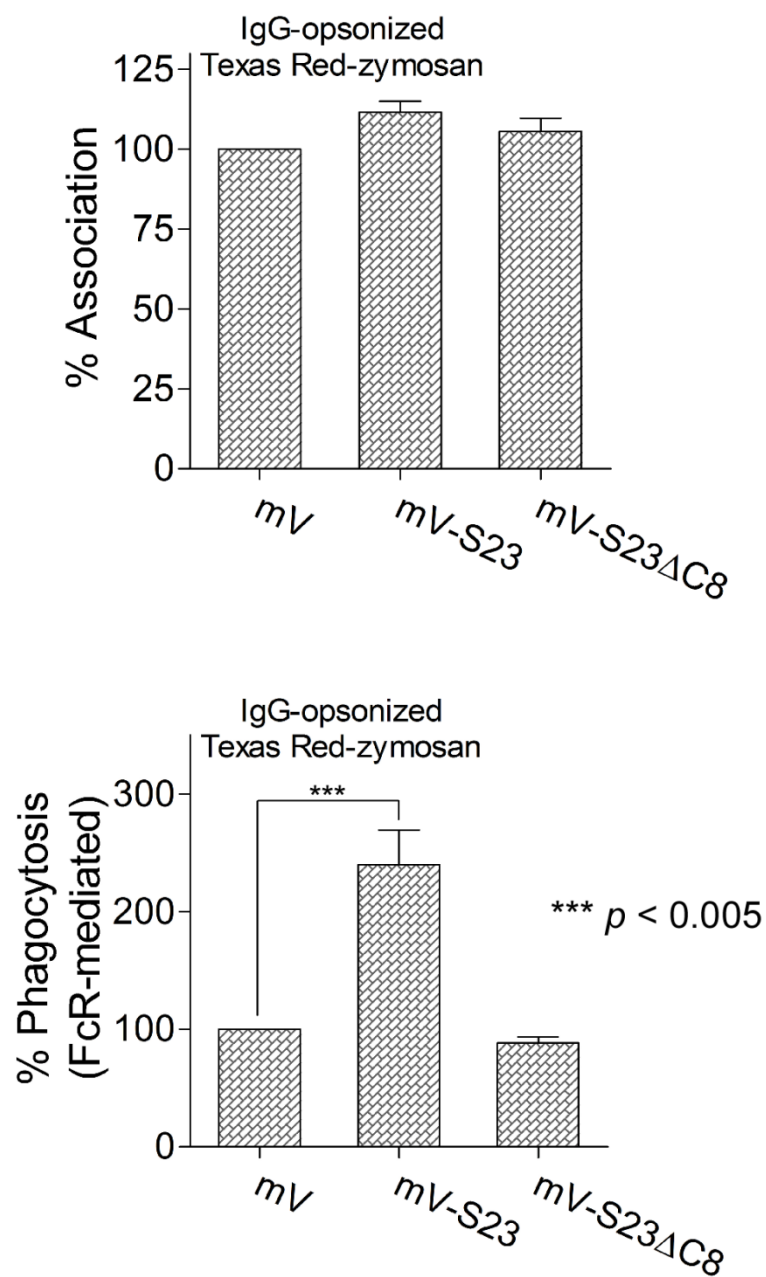


図 3-1-4-2. OTRZ を用いたファゴサイトーシス効率の測定 (1)

- (上) OTRZ と細胞膜との接触効率に差はなかった。
- (下) mV 細胞における OTRZ の取り込み量を 100%として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。mV 細胞に比べて mV-S23 細胞では 2 倍以上の亢進が見られた一方、mV-S23ΔC8 細胞は mV 細胞と同程度だった。

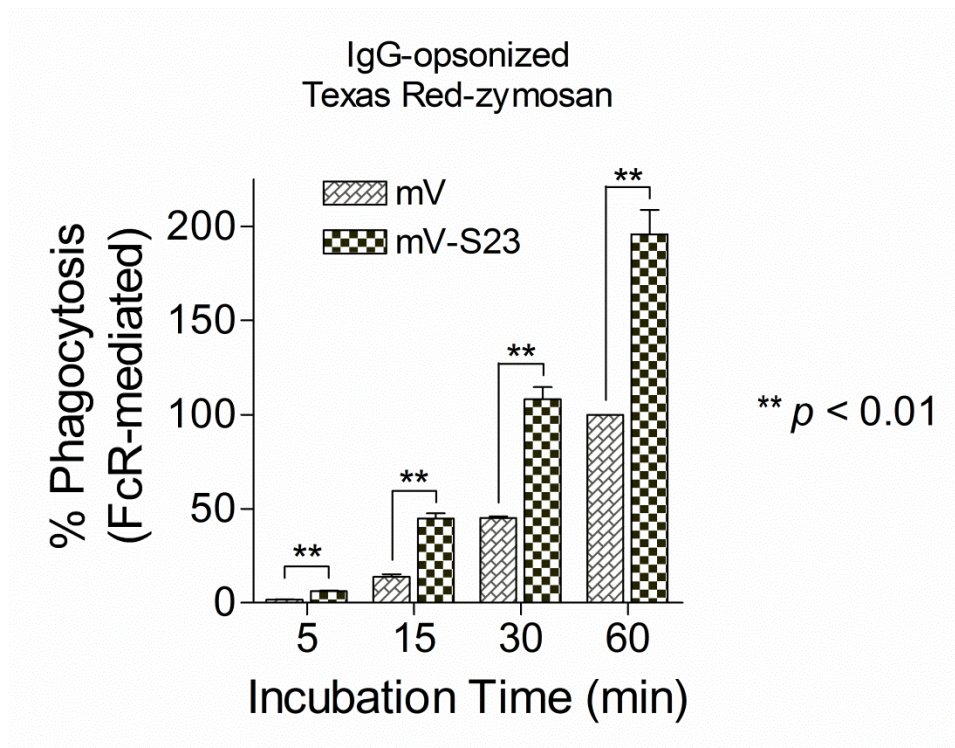


図 3-1-4-3. OTRZ を用いたファゴサイトーシス効率の測定 (2)

OTRZ を細胞に与えて時間経過ごとに測定し、mV 細胞における OTRZ の取り込み量の最大値 (60 min) を 100%として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。mV 細胞に比べて mV-S23 細胞では、経過時間のどの段階でも顕著な効率の上昇が見られた。

3.1.5 単離ファゴソームの生化学的解析

ライソゾーム局在タンパク質と NOX2 複合体因子のファゴソームへの局在化は亢進した

これまでの研究から、SNAP-23 の過剰発現はファゴソーム膜上での ROS の産生 (NOX2 複合体の形成・活性化) と内部の酸性化 (V-ATPase の局在化) を亢進することがわかった。これらを生化学的に検証するため、細胞から精製したファゴソームを Western blot 法によって解析した。ファゴソームは、mVenus 融合タンパク質の発現細胞 (mV と mV-S23) に IgG でオプソニン化したラテックスビーズを与えて 10 分間ファゴサイトーシスさせた状態 (10/0 とする) とその後 120 分間培養した状態 (10/120 とする) からシヨ糖密度勾配遠心法により単離・精製した。これらのファゴソーム (phago 10/0 と phago 10/120) を比べることにより、成熟にともなうファゴソーム局在タンパク質の変化を調べた。

ライソゾーム局在タンパク質である LAMP-1 や V-ATPase のサブユニットである a3 アイソフォーム (ライソゾーム関連オルガネラ局在) のファゴソームへの局在化を調べた結果、mV-S23 細胞の phago 10/0 および 10/120 で mV 細胞よりも局在量が顕著に増加していた (図 3-1-5-1)。つまり、mV-S23 細胞ではライソゾームとの融合が比較的早い段階で起きていることが明らかになった。

また、NOX2 複合体の形成因子である gp91^{phox} や p22^{phox} は、mV-S23 細胞の phago 10/0 で mV 細胞よりも局在量が増加したが、phago 10/120 では mV 細胞と同程度の局在量となった。これらの結果は、先述したファゴソーム内部の ROS 産生および酸性化の亢進とよく一致する。ファゴソームの成熟過程で機能するといった報告がある syntaxin7 や syntaxin13^[25]については、今回の実験では、mV 細胞と mV-S23 細胞とで差は見られなかった。

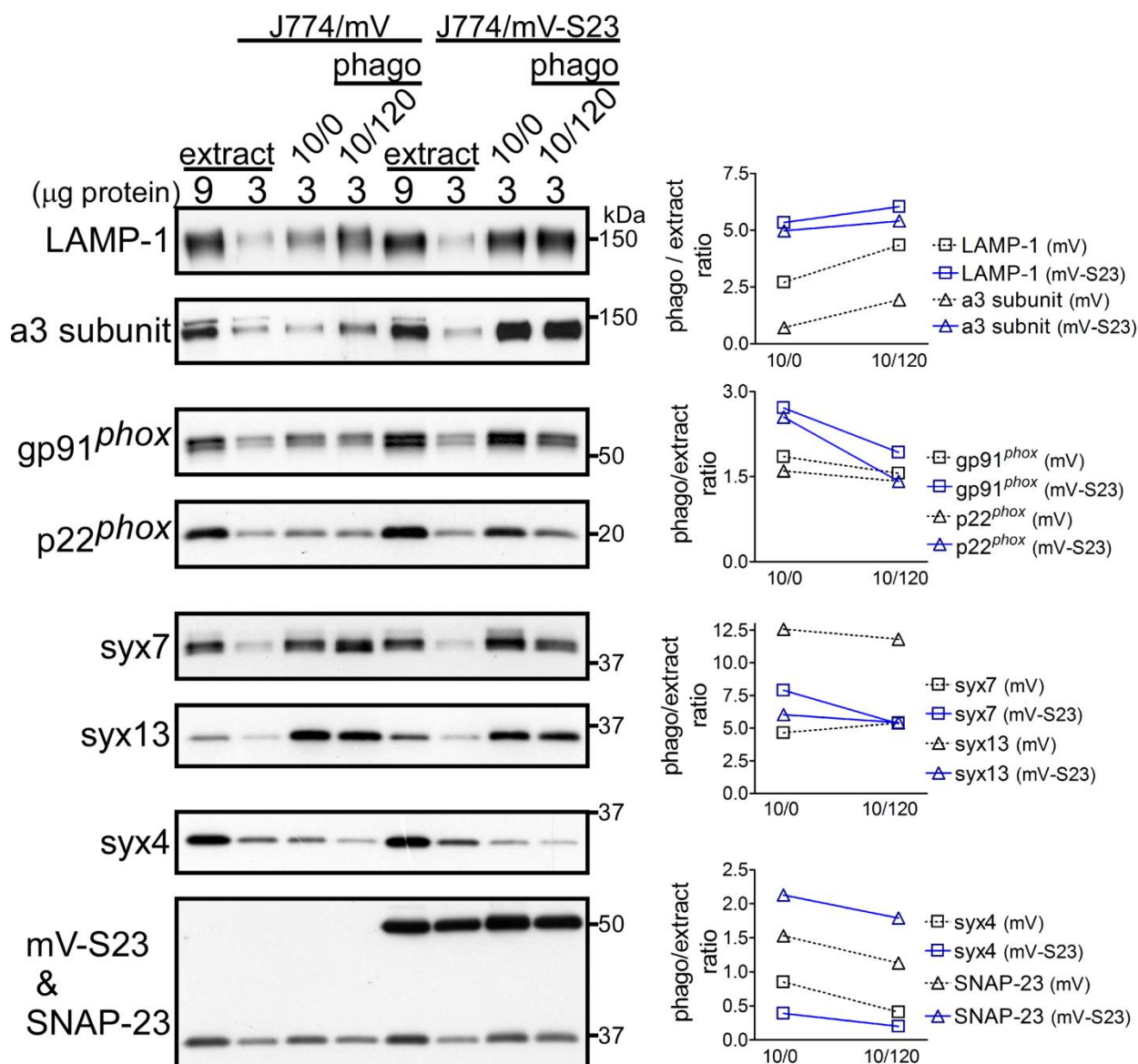


図 3-1-5-1. Western blot 解析による単離ファゴソームの比較

細胞にラテックスビーズを与えて形成させたファゴソームをショ糖密度勾配遠心法により単離した。extract は遠心操作前の核除去細胞抽出液のことである。10 分間取り込ませた細胞を回収した場合 (10/0) と過剰なビーズを除きさらに 120 分間培養した場合 (10/120) のファゴソーム (3 μ g) について含まれるタンパク質を比較した。右は各タンパク質において 3 μ g extract を基準とした場合の phago10/0 や phago10/120 の割合を示したものである。画像の解析には、画像解析ソフト (ImageJ) を用いた。mV-S23 細胞では、LAMP-1 や a3 サブユニット、NOX2 複合体の形成因子 (gp91^{phox}, p22^{phox}) のファゴソームへの局在化が mV 細胞よりも早い段階 (10/0) で起きていることがわかった。

3.1.6 SNAP-23 と相互作用する SNARE タンパク質の解析

SNAP-23 過剰発現マクロファージについての免疫沈降実験

これまで、mV-S23 細胞と mV-S23 Δ C8 細胞との間には、異物の取り込み量(図 3-1-4-2, 図 3-1-4-3) やファゴソームの成熟 (図 3-1-3-2, 図 3-1-3-9) に違いが見られた。これについて、mV-S23 や mV-S23 Δ C8 と他の SNARE タンパク質との相互作用の変化による可能性を考え、免疫沈降実験により解析した。

mVenus 融合タンパク質発現細胞の細胞抽出液について、抗 EGFP 抗体を用い免疫沈降を行った結果、細胞膜局在の SNARE タンパク質である syntaxin3 や syntaxin4, VAMP5 は mV-S23 と mV-S23 Δ C8 の両者と同程度の相互作用が見られたが、syntaxin2 はどちらともほとんど結合しなかった (図 3-1-6-1 : 左)。

一方、syntaxin11 (細胞膜局在) やエンドソーム局在タンパク質である syntaxin7, syntaxin13, VAMP3, VAMP7, VAMP8 においては、mV-S23 において mV-S23 Δ C8 よりも強い相互作用が見られた (図 3-1-6-1 : 右)。このことは、mV-S23 細胞と比較して mV-S23 Δ C8 細胞ではファゴソームの形成や成熟の低下が見られることと一致する。これらの結果は、mV-S23 が内在性の SNAP-23 の細胞膜やファゴソーム膜上での膜融合機能を促進 (増強) していることを示唆している。

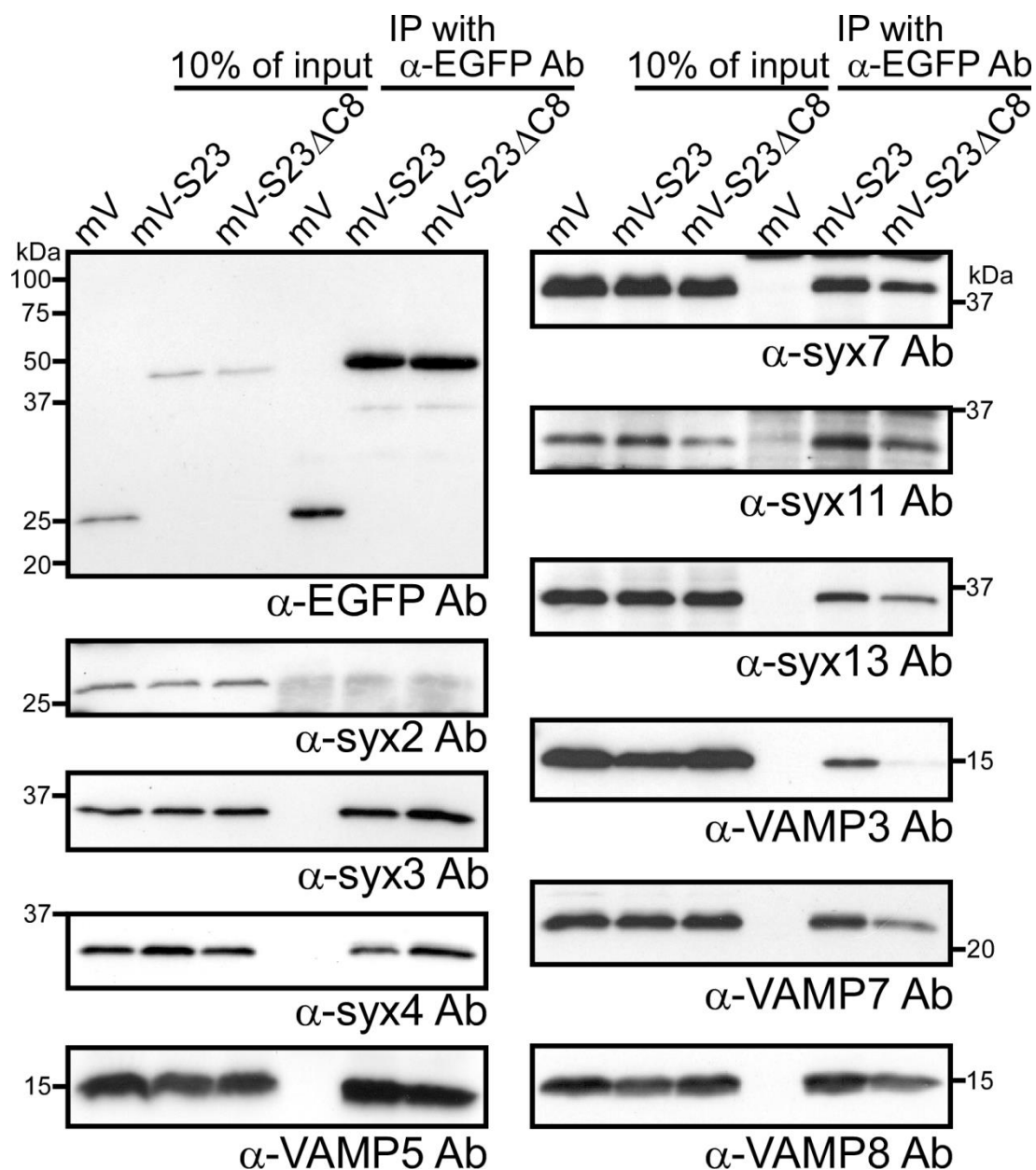


図 3-1-6-1. 免疫沈降実験による mVenus 融合タンパク質と相互作用する SNARE タンパク質の解析

mVenus 融合タンパク質発現細胞の抽出液について、抗 EGFP 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。相互作用するタンパク質は特異的抗体により検出した。その結果、syntaxin11 やエンドソーム局在 SNARE タンパク質について mV-S23 細胞と mV-S23ΔC8 細胞とで結合量の差が見られた。

SNARE タンパク質を共発現させた HEK293T 細胞での免疫沈降実験

図 3-1-6-1 で見られた mV-S23 と mV-S23 Δ C8 における VAMP3, VAMP7 との顕著な相互作用の差は、mV-S23 と mV-S23 Δ C8 の細胞内局在を比較した場合、前者ではエンドソーム様の構造体での発現がより顕著に観察されたこと（図 3-1-1-5）から、VAMP3 や VAMP7 との相互作用はタンパク質の親和性というより SNAP-23 の細胞内局在の違いを反映している可能性も考えられた。このことを検証するために、VAMP3 と VAMP7 の C 末端側の膜貫通領域を欠失させオルガネラへの局在化を不能（細胞質局在）にした変異体を用いた実験を行った。

膜貫通領域を欠失させた VAMP3 (VAMP3 Δ TMD), VAMP7 (VAMP7 Δ TMD) に mVenus を付加した mVenus-VAMP3 Δ TMD (mV-V3 Δ TM), mVenus-VAMP7 Δ TMD (mV-V7 Δ TM) と、FLAG タグを付加した SNAP-23 (FLAG-SNAP-23), SNAP-23 Δ C8 (FLAG-SNAP-23 Δ C8) を HEK293T 細胞に一過的に共発現させた。これらの細胞抽出液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行い、抗 EGFP 抗体で mVenus 融合タンパク質の相互作用を検証した。

その結果、SNAP-23 Δ C8 は膜貫通領域を持たない VAMP3 や VAMP7 の場合でも結合量が減少しており（図 3-1-6-2：下）、図 3-1-6-1 の実験結果は、細胞内における局在の影響ではなくタンパク質の相互作用によるものであることが明らかになった。

以上の結果から、ファゴサイトーシスやファゴソーム成熟過程での SNAP-23 のパートナー分子として VAMP3 や VAMP7 が候補として考えられた。しかし、厳密には単離ファゴソームなどを材料とした免疫沈降実験による相互作用の検証や候補分子を発現抑制した場合のファゴソーム成熟への影響などを調べる必要があり、今後の課題である。

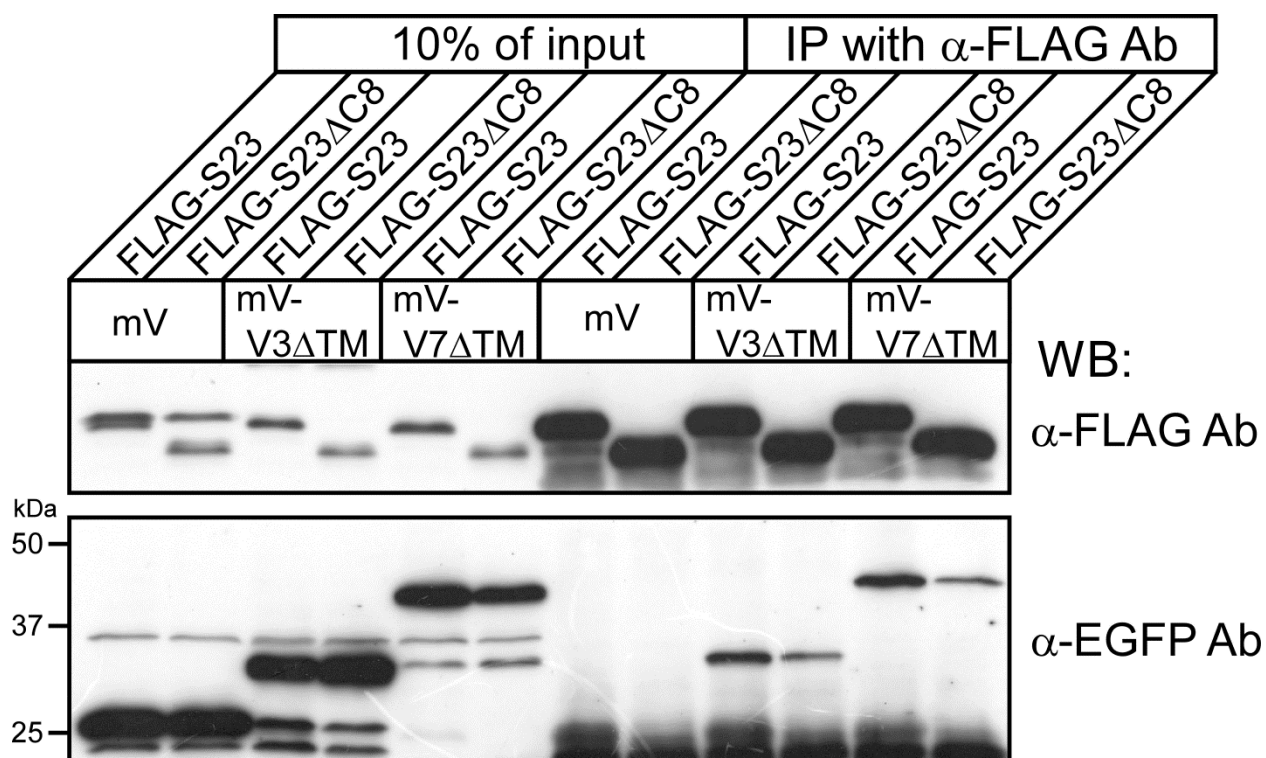


図 3-1-6-2. HEK293T 細胞に SNAP-23 と相互作用が予想される SNARE タンパク質を共発現させた場合の免疫沈降実験による解析

抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行った結果。上段は抗 FLAG 抗体を用いた Western blot 解析で、FLAG 融合タンパク質の免疫沈降を確認した。下段は抗 EGFP 抗体を用いて、mVenus-VAMP3ΔTMD (mV-V3ΔTM) と mVenus-VAMP7ΔTMD (mV-V7ΔTM) の共沈降を確認した。その結果、FLAG-SNAP-23 (FLAG-S23) に比べ FLAG-SNAP-23ΔC8 (FLAG-S23ΔC8) の場合に mV-V3ΔTM と mV-V7ΔTM の両者とも結合 (共沈降) 量が減少していた。mV-V3ΔTM と mV-V7ΔTM は膜貫通領域が欠失していて細胞質局在なので、図 3-1-6-1 で見られた結合量の差は、細胞内局在の違いを反映した結果ではないことが明らかになった。

3.1.7 低分子干渉 RNA 法による SNAP-23 の発現抑制

Western blot 法と免疫染色法による SNAP-23 の発現抑制の確認

低分子干渉 (small interfering) RNA (siRNA) 法は、2001 年に報告された遺伝子の特異的発現抑制法の一つである^[35]。約 21 mer からなる短い 2 本鎖 RNA を動物細胞に導入することで、配列特異的に遺伝子の発現抑制を起こすことが可能である。そこで、SNAP-23 のタンパク質コーディング領域から 21 mer の配列を選び、相応する 2 本鎖 RNA (siRNA) を 2 種類合成した。これらの siRNA を J774 細胞に導入 (トランスフェクション) することで SNAP-23 の発現抑制を試み、その時のファゴサイトーシスやファゴソーム成熟への効果を検証することで、SNAP-23 の機能解析を行った。本研究では、SNAP-23 のコーディング領域をターゲット配列とする siRNA (SNAP-23 siRNA#1) と、5'側非翻訳領域をターゲット配列とする siRNA (SNAP-23 siRNA#2) の二種類の異なる配列の siRNA を用いた (図 3-1-7-1)。

はじめに、siRNA をトランスフェクションした試料について免疫染色法 (図 3-1-7-2, 図 3-1-7-3, 図 3-1-7-4) と Western blot 法 (図 3-1-7-5, 図 3-1-7-6) により SNAP-23 の発現が抑制されていること、また調べた限りの他のタンパク質の発現状態への影響はないことを確認した。

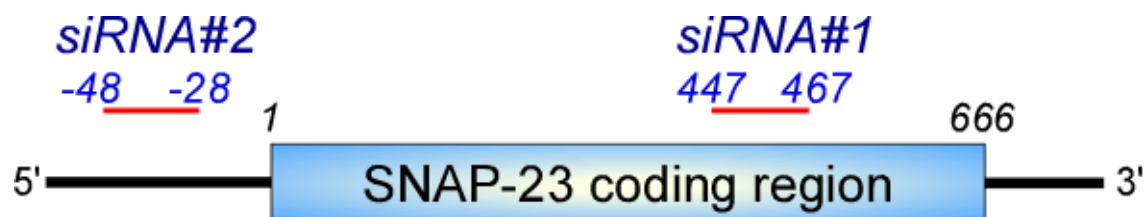


図 3-1-7-1. SNAP-23 siRNA のターゲット部位

SNAP-23 siRNA#1 は SNAP-23 のコーディング領域をターゲットとする siRNA である。一方、SNAP-23 siRNA#2 は 5'側の非翻訳領域をターゲットとしている。

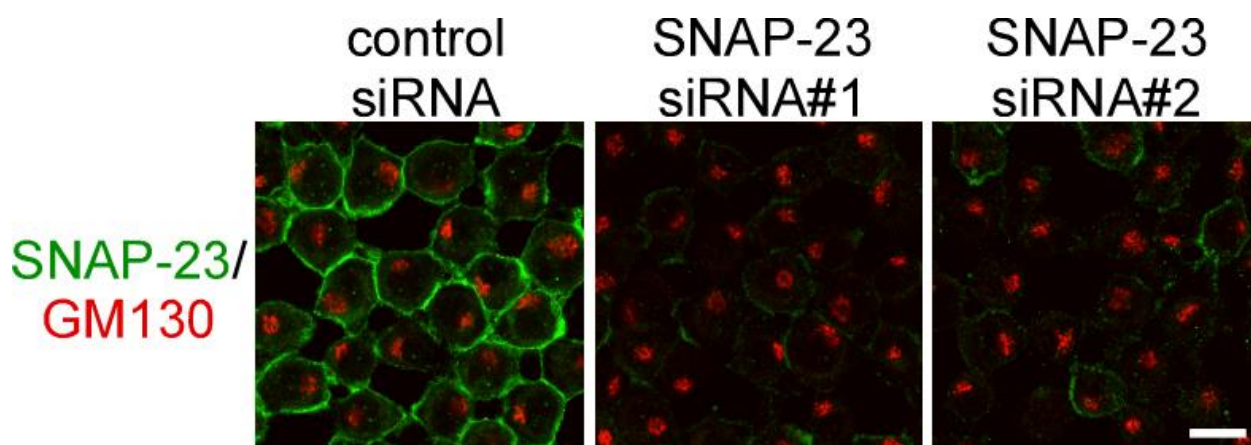


図 3-1-7-2. siRNA トランスフェクションによる SNAP-23 の発現への影響（免疫染色法）

SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞を抗 SNAP-23 抗体と Alexa 488 標識二次抗体、抗 GM130（ゴルジ体局在）抗体と Alexa 594 標識二次抗体により免疫染色し、共焦点顕微鏡により観察した。control siRNA に比べ、SNAP-23 siRNA#1 および SNAP-23 siRNA#2 では SNAP-23 の発現量が減少していた。Bar, 10 μ m

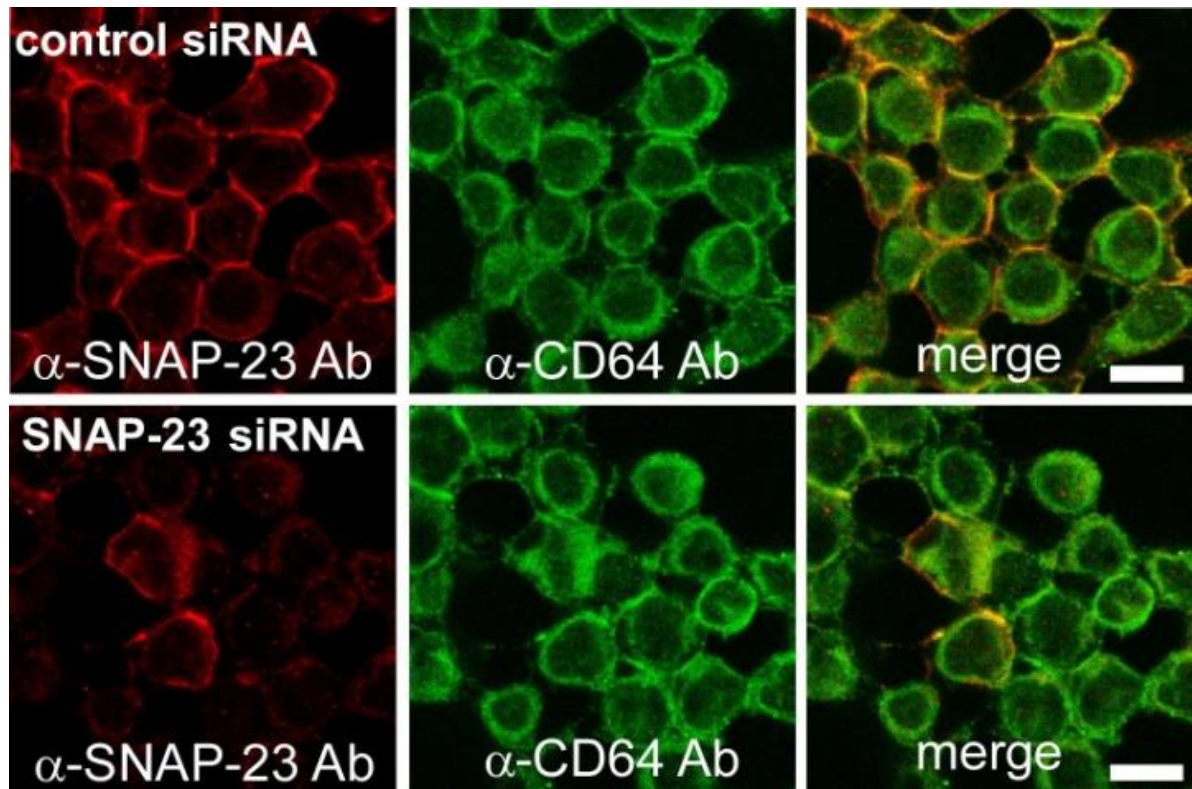


図 3-1-7-3. siRNA トランスフェクションによるタンパク質発現への影響（免疫染色法）（1）

- （左） SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞を抗 SNAP-23 抗体と Alexa 594 標識二次抗体により免疫染色し、共焦点顕微鏡により観察した。control siRNA の場合に比べ SNAP-23 の染色は減少していることがわかった。Bar, 10 μ m
- （中） SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞を抗 CD64 抗体と Alexa 488 標識二次抗体を用いて観察し、siRNA トランスフェクションの影響を調べたところ、CD64 の発現量には変化が見られなかった。Bar, 10 μ m

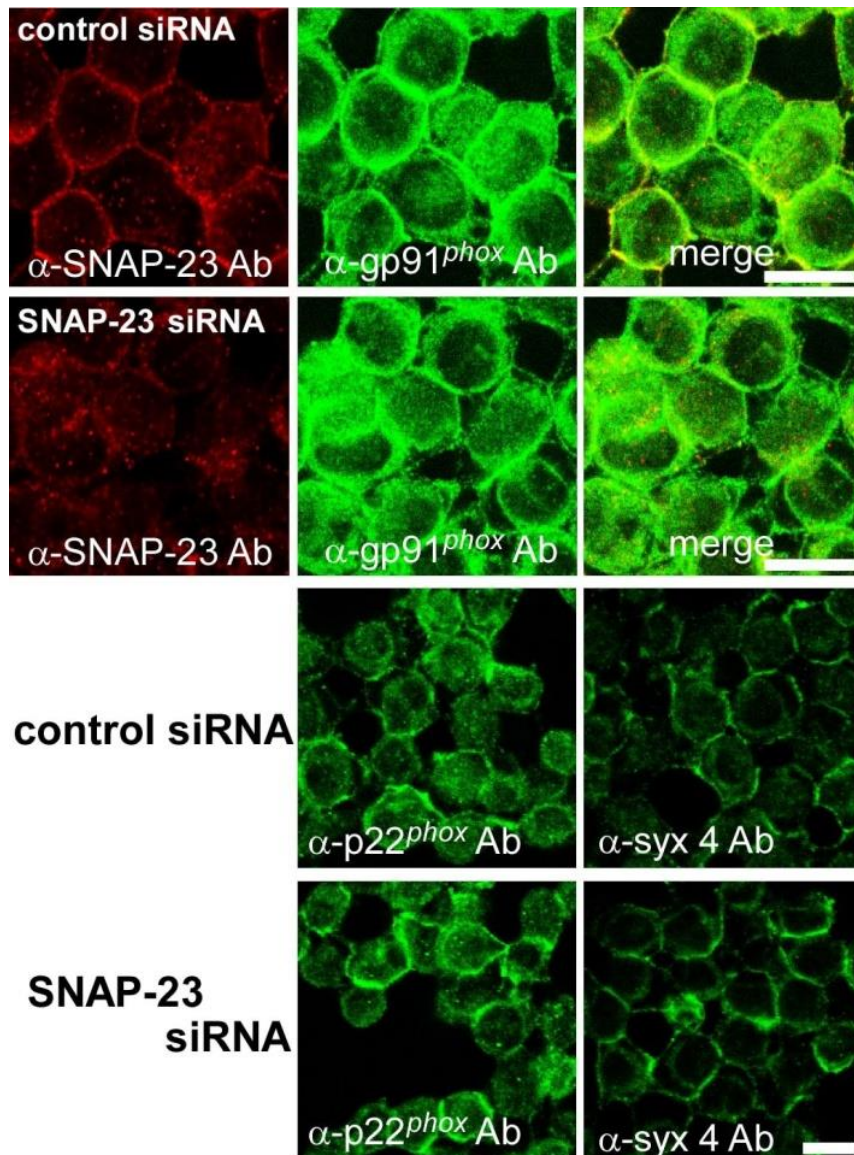


図 3-1-7-4. siRNA トランスフェクションによるタンパク質発現への影響（免疫染色法）（2）

- （上） SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞を抗 SNAP-23 抗体と Alexa 594 標識二次抗体および抗 gp91^{phox} 抗体と Alexa 488 標識二次抗体により免疫染色し、共焦点顕微鏡により観察した。SNAP-23 の発現量は減弱しているが、gp91^{phox} には影響がないことを確認した。Bar, 10 μ m
- （下） SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞を抗 p22^{phox} 抗体と抗 syntaxin4 (syx4) 抗体を用いて観察した。どちらのタンパク質も細胞間に発現量の違いは見られなかった。なお、二次抗体には Alexa 488 標識二次抗体を用いた。Bar, 10 μ m

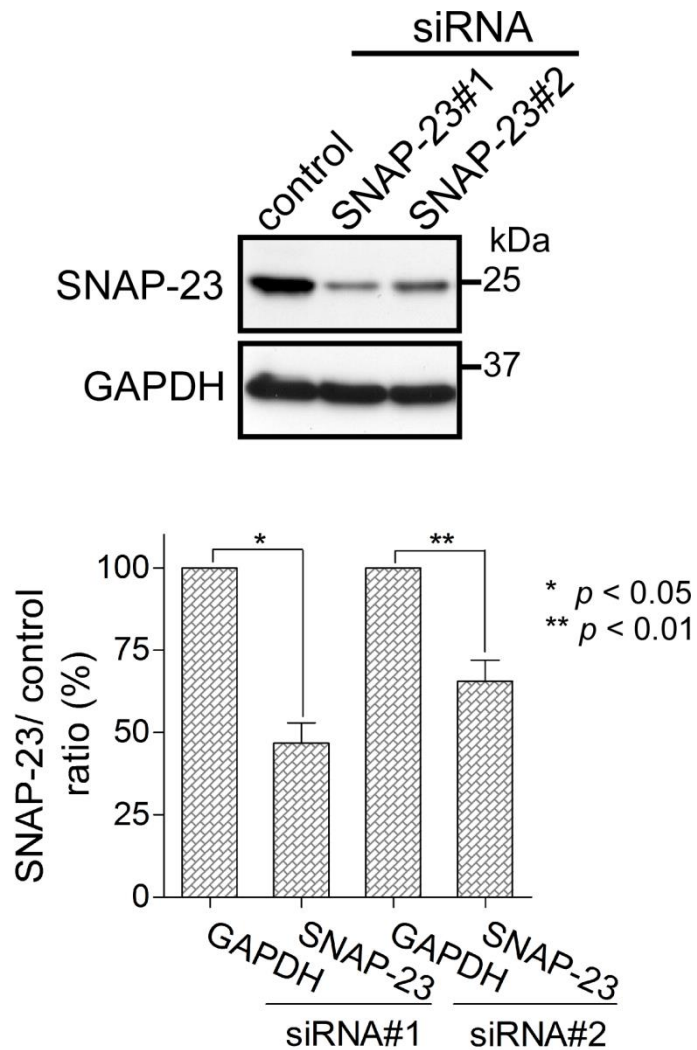


図 3-1-7-5. siRNA トランスフェクションによる SNAP-23 の発現への影響（Western blot 法）

Western blot 法により、SNAP-23 の発現が 50%程度に抑制されていることを確認した。下は GAPDH の発現量における control siRNA の場合と SNAP-23 siRNA の場合の割合（SNAP-23/control）を 100%とし、SNAP-23 の発現量を標準化した。画像の解析には、画像解析ソフト（ImageJ）を用いた。

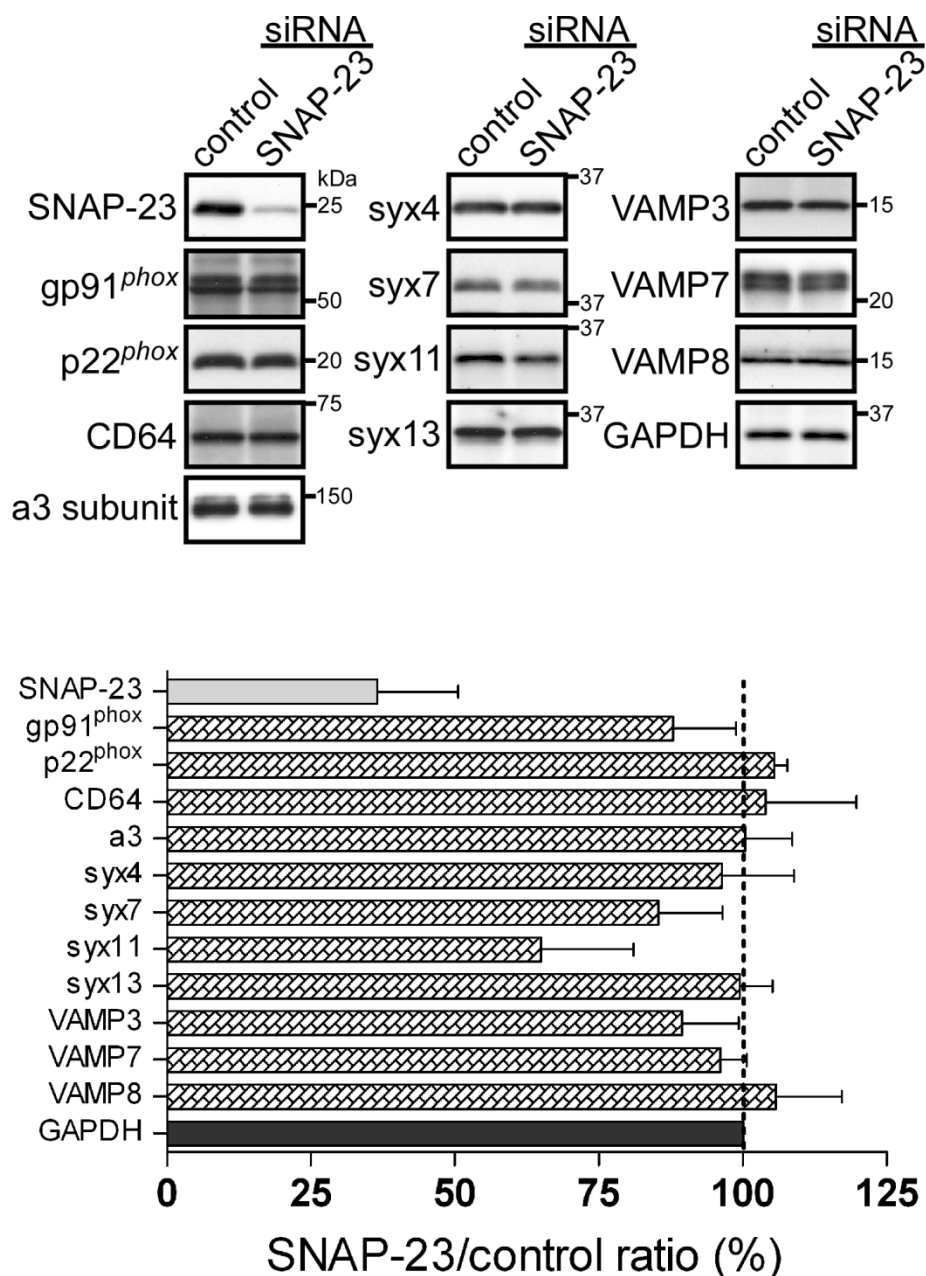


図 3-1-7-6. siRNA トランスフェクションによるタンパク質発現への影響（Western blot 法）

control siRNA と SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞それぞれの抽出液について、Western blot 法によりタンパク質の発現量を確認した。下は GAPDH の発現量における control siRNA の場合と SNAP-23 siRNA の場合の割合 (SNAP-23/control) を 100% とし、SNAP-23 や他のタンパク質の発現量を標準化した。画像の解析には、画像解析ソフト (ImageJ) を用いた。

3.1.8 SNAP-23 の発現抑制が活性酸素種の産生に及ぼす影響の検証

ファゴソーム内部の活性酸素種の産生は減少した

SNAP-23 を過剰発現した細胞と同様に、SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞について、ルミノールビーズを用いてファゴソーム内部への ROS 産生量を測定した。

その結果、SNAP-23 siRNA により発現抑制した細胞 (○) では、コントロール細胞 (●) に比べてルミノールビーズの活性化が約 50%に減少していた (図 3-1-8-1)。これは、SNAP-23 の発現抑制によってルミノールビーズの取り込み、あるいはファゴソーム内部の ROS 産生が阻害されている可能性を強く支持する結果と考えられる。

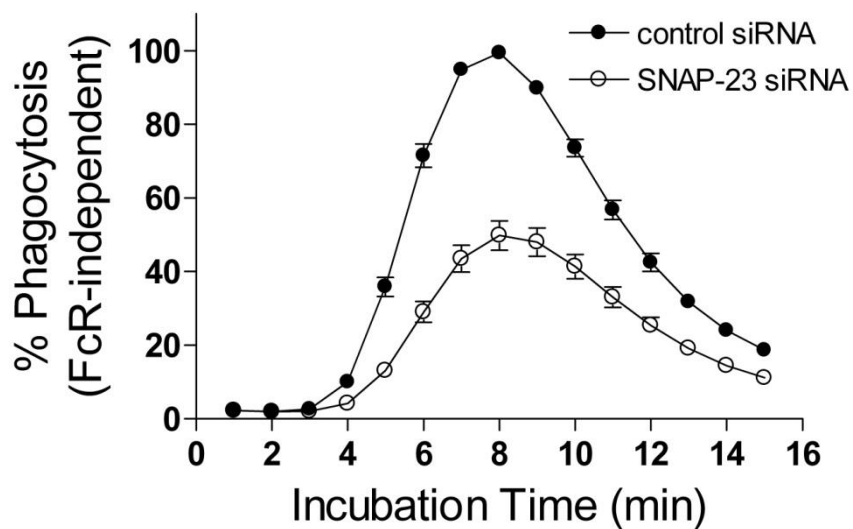


図 3-1-8-1. SNAP-23 の発現抑制細胞におけるルミノールビーズを用いたファゴソーム内部に産生される ROS の測定

SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞 (○) では、検出される化学発光量がコントロール細胞 (●) に比べて約 50%にまで減少していた。得られた値は、control siRNA をトランスフェクションした細胞における最大値を 100%として他の値を規格化した。

細胞外への活性酸素種の放出量は低下した

次に、細胞膜上の NOX2 複合体形成による細胞外への ROS 放出に及ぼす SNAP-23 発現抑制の影響を検証したところ、発現抑制細胞（○）ではコントロール細胞（●）に比べて約 40%まで減少していた（図 3-1-8-2）。このことは、SNAP-23 が細胞膜での ROS の産生、つまり NOX2 複合体の形成に機能することを示唆している。

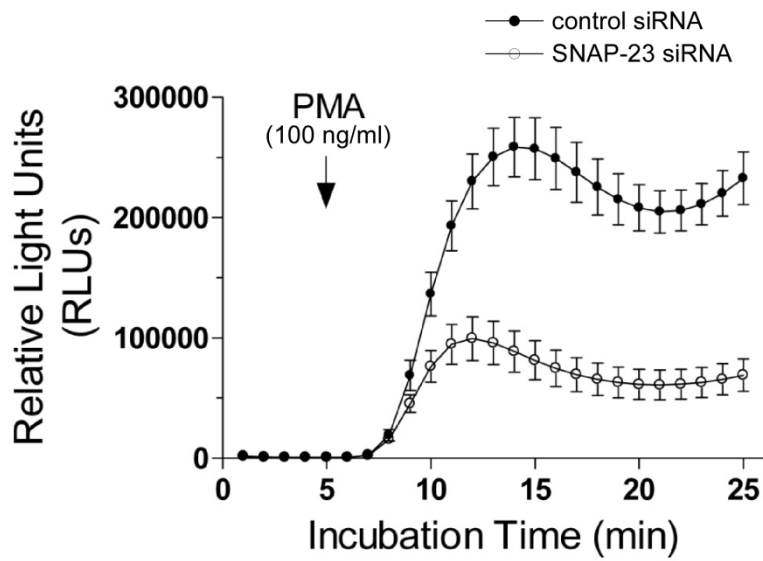


図 3-1-8-2. SNAP-23 の発現抑制細胞における PMA 刺激時の ROS 放出量の測定

SNAP-23 の発現を抑制した細胞（○）では、PMA の刺激によって細胞外へ放出される ROS の量が control siRNA（●）の場合に比べ顕著に阻害された。

3.1.9 SNAP-23 の発現抑制がファゴソームの形成過程へ及ぼす影響についての検証

発現抑制細胞ではファゴサイトーシス効率は低下した

SNAP-23 の発現抑制細胞についてのルミノールビーズを用いた ROS 産生の結果（図 3-1-8-1）はビーズ自体の取り込み阻害を反映したものである可能性があるため、OTRZ を用いて直接の取り込み量について検証した。その結果、SNAP-23 の発現抑制細胞では、OTRZ の取り込み量がコントロール細胞に比べて 50%以下にまで低下していた（図 3-1-9-1：下）。このとき、細胞膜と OTRZ との接触効率に差はなかった（図 3-1-9-1：上）。

ファゴサイトーシスに関与する Fc 受容体の CD64 の局在や発現に変化が見られない（図 3-1-7-3，図 3-1-7-6）ことから、ここで見られた阻害は SNAP-23 siRNA による二次的な影響ではなく、ターゲットである SNAP-23 の機能が抑制された結果と考えられる。つまり、SNAP-23 がファゴサイトーシスの取り込み過程において必須な因子であることを意味する。また、ファゴサイトーシス自体が阻害されていたので、図 3-1-8-1 の結果に関して、SNAP-23 siRNA によるファゴソーム成熟過程への影響があると明確に結論付けることはできず、今後、解析の工夫が必要と考えられる。

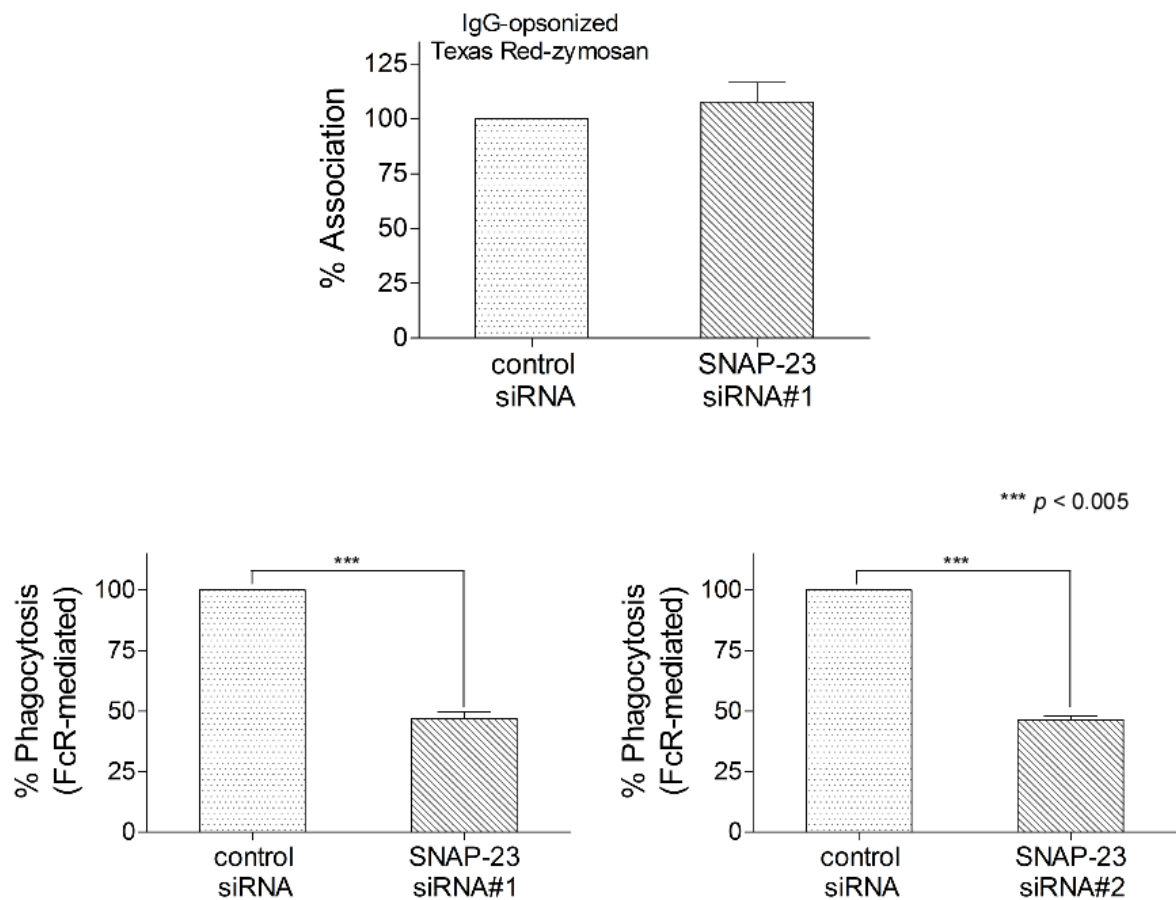


図 3-1-9-1. SNAP-23 の発現抑制細胞におけるファゴサイトーシス効率の測定

- (上) OTRZ と細胞膜との接触効率に差はなかった。
- (下) SNAP-23 の発現抑制細胞では、ファゴサイトーシスによって細胞内に取り込まれる OTRZ 量が control siRNA の細胞と比べ 50%以下に減少した。control siRNA をトランスフェクションした細胞における OTRZ の最大の取り込み量を 100%として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。

3.1.10 SNAP-23 の発現抑制がファゴソームの成熟過程へ及ぼす影響についての検証

pHrodo-*S. aureus* を用いた発現抑制細胞のファゴソーム内部酸性化への影響

SNAP-23 の発現を抑制した場合のファゴソームの成熟過程への影響を調べるため、SNAP-23 の発現を抑制した細胞を用いてファゴソーム内部の酸性化への影響を検証した。SNAP-23 siRNA をトランスフェクションしてから 72 時間後の J774 細胞について、過剰発現した先の場合と同様に、オプソニン化 pHrodo-*S. aureus* を用いて解析した。その結果、コントロール細胞に比べると SNAP-23 を発現抑制した細胞ではファゴソーム内部の酸性化が遅れていた（データ掲載せず）。しかし、SNAP-23 の発現抑制は先に示したように OTRZ の取り込みに阻害的に影響する（図 3-1-9-1）ので、今回の場合も pHrodo-*S. aureus* の取り込みの阻害を反映している可能性が考えられた。取り込まれた *S. aureus* だけをモニターできれば、SNAP-23 siRNA の酸性化への影響を解析できると思われるが、菌体が小さいために取り込まれたことの確認が難しい。

そこで、ファゴソーム内部の酸性化について、コントロール細胞と SNAP-23 発現抑制細胞との違いを見るために、比較的大きいラテックスビーズを用いて次の実験を行った。

ファゴソームの成熟は抑制された（GFP 結合ビーズを用いた検証）

SNAP-23 の発現抑制によるファゴソーム内部の酸性化への影響について、pHrodo-*S. aureus* を用いて行った実験では確認できなかった。そこで、ラテックスビーズ（直径 3.0 μm ）に精製した GFP を結合させ、さらに抗 EGFP 抗体でオプソニン化した GFP 結合ビーズを用いて解析を行った。GFP は酸性環境下で蛍光が減弱する性質を有するため、フ

ファゴソームに取り込まれた GFP 結合ビーズは、ファゴソームの成熟にともなって酸性化や分解の影響を受け蛍光が弱くなる。また、どの時点でビーズが細胞に取り込まれたかの判断をするために、ここでは C 末端に TagRFP（赤色蛍光タンパク質）を付加させた FcγRIIA（Fc 受容体の一つ）を安定発現する J774 細胞（J774/RIIa-TagRFP）を用いた。この細胞を利用することで、内部に取り込まれたビーズを含むファゴソームは赤色蛍光で目視でき、細胞外のビーズと区別できる。これら GFP 結合ビーズと J774/RIIa-TagRFP を用いて共焦点顕微鏡によりファゴソームの成熟化を観察した（図 3-1-10-1）。実際には、J774/RIIa-TagRFP に siRNA をトランスフェクションし、GFP 結合ビーズを取り込ませてからの経過時間ごとのファゴソームについて、GFP 結合ビーズの蛍光の強さにより蛍光が強いビーズから順に type A , type B , type C , type D の四種類（図 3-1-10-2：中）に分類し、それぞれの割合を計測した。

ファゴソームの総数を 100%としたときの各 type の割合を示したのが図 3-1-10-3、図 3-1-10-4 であるが、GFP 結合ビーズを取り込ませてから 30 分経過後の type D（GFP シグナルが完全に退色したビーズを含むファゴソーム）の割合に着目すると、コントロール細胞では約 35%であるのに対し、SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞では 15%程度であった。つまり、SNAP-23 の発現抑制によりファゴソームの成熟は遅延していることがわかった。

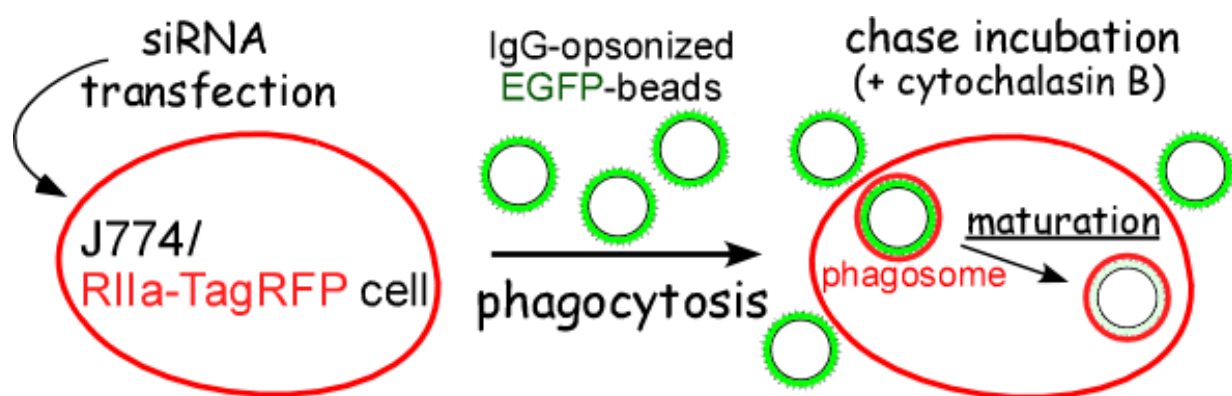


図 3-1-10-1. GFP 結合ビーズを用いたファゴソーム成熟についての解析の概略

J774/RIIa-TagRFP に siRNA をトランスフェクションし、オプソニン化した GFP 結合ビーズをファゴサイトーシスさせた。GFP はファゴソームの成熟にともなう内部の酸性化および分解によって退色するため、GFP の蛍光の強さをファゴソーム成熟の指標とした。

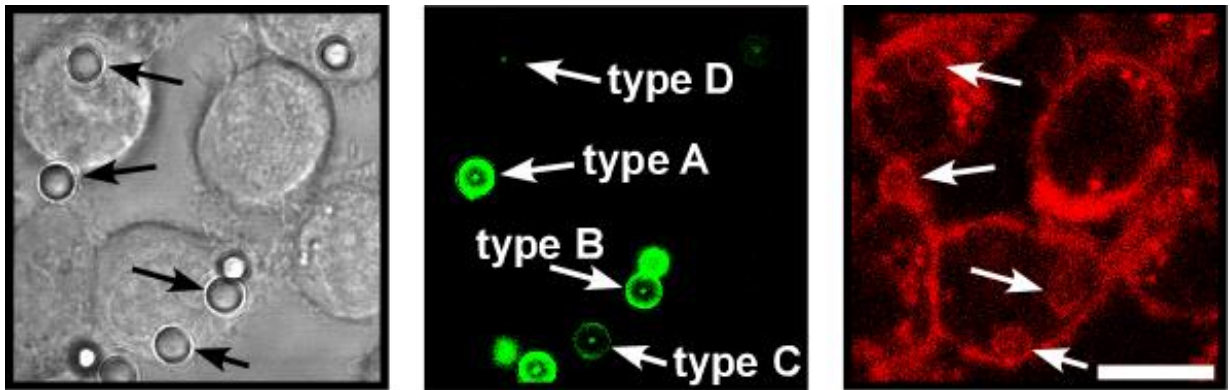


図 3-1-10-2. GFP 結合ビーズの蛍光強度における四種の分類

細胞内に取り込まれた GFP 結合ビーズはファゴソームの成熟とともに退色する。各ファゴソームについて蛍光が強いものから順に type A, type B, type C, type D と分類した。Bar, 10 μ m

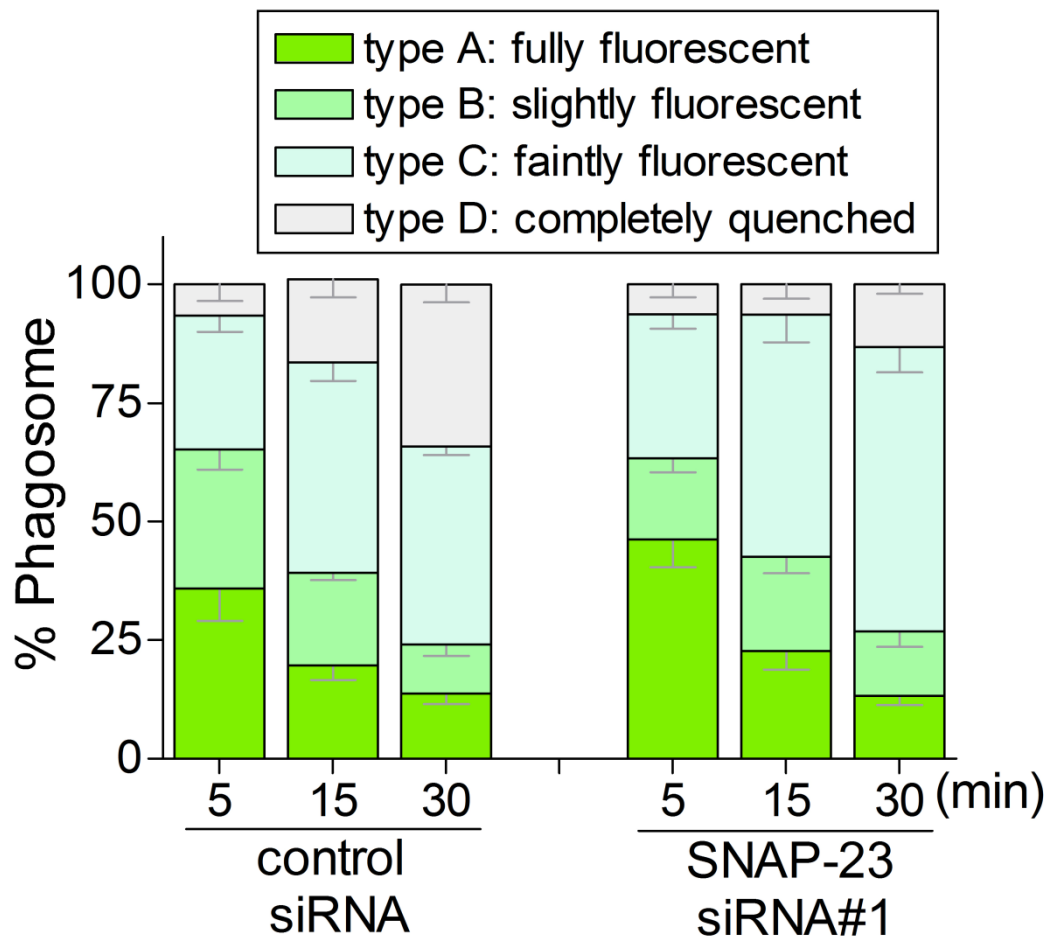


図 3-1-10-3. GFP 結合ビーズを用いたファゴソーム成熟についての解析 (1)

GFP 結合ビーズを細胞に与え、経過時間ごとのファゴソームを共焦点顕微鏡下で観察し、ファゴソームの総数を 100%としたときの type A, type B, type C, type D の割合を示した。30 分経過後の蛍光が全く見られない type D のファゴソームに着目すると、control siRNA をトランスフェクションした細胞に比べて SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞での割合が顕著に減少していた。

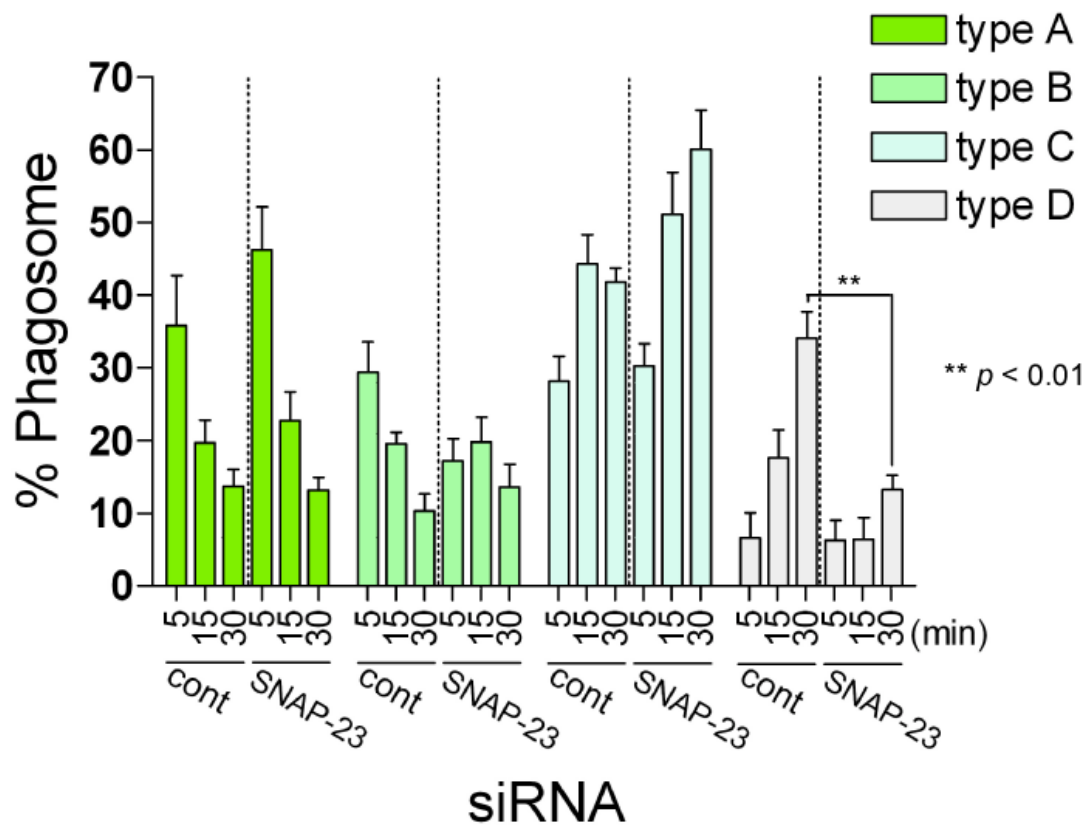


図 3-1-10-4. GFP 結合ビーズを用いたファゴソーム成熟についての解析 (2)

図 3-1-10-3 と同じデータについて、経過時間およびファゴソームの type についてそれぞれ異なるバーで示した。30 分経過後の type D は、SNAP-23 の発現抑制によりその割合が顕著に減少していた。

ファゴソーム内部の酸性化は抑制された (LysoTracker を用いた検討)

SNAP-23 発現抑制細胞におけるファゴソーム内部の酸性化について、過剰発現の場合と同様に LysoTracker を用いて検討した。siRNA をトランスフェクションした細胞について、予め LysoTracker 処理により酸性オルガネラを染色した。この細胞にラテックスビーズをファゴサイトーシスさせ、経過時間ごとに LysoTracker で染色されたファゴソームの割合を計測したところ、SNAP-23 の発現を抑制した場合に LysoTracker で染まったファゴソームの割合が減少していた (図 3-1-10-5 : 下)。このことは、ファゴソームの酸性化が遅延したことを意味する。なお、LysoTracker による酸性オルガネラの染色効率 (蛍光強度) については、control siRNA をトランスフェクションした細胞と SNAP-23 siRNA#1 をトランスフェクションした細胞との間に有意な差はなかった (図 3-1-10-5 : 上)。

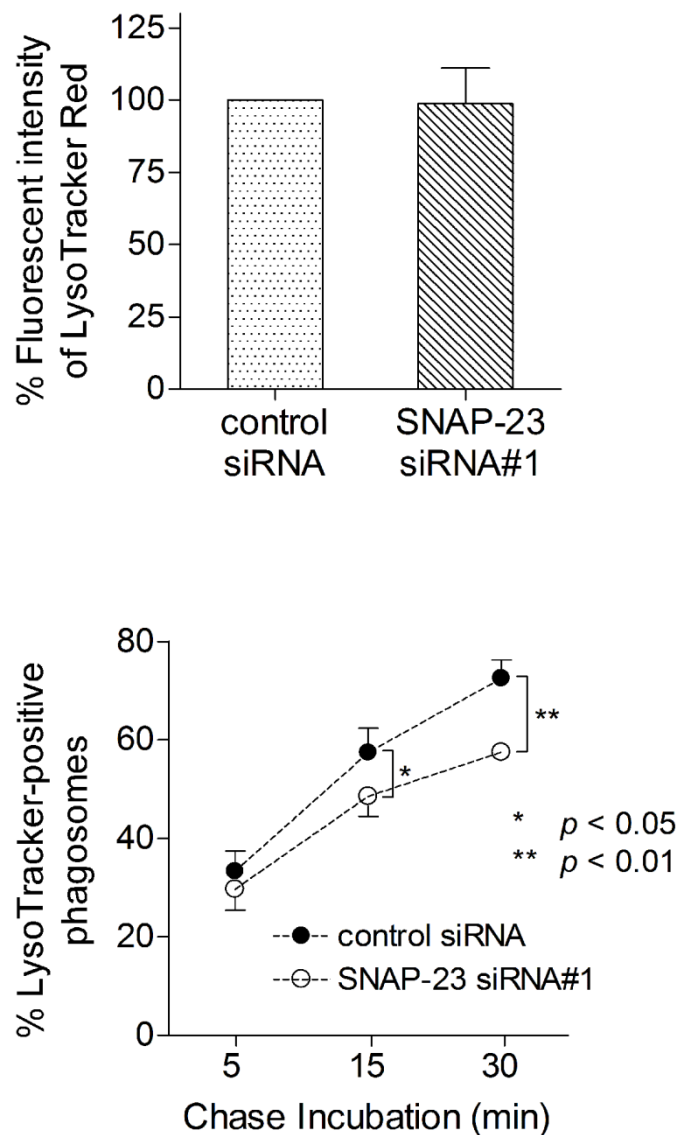


図 3-1-10-5. SNAP-23 の発現抑制細胞における LysoTracker を用いたファゴソーム酸性化の測定

- (上) siRNA トランスフェクション後の LysoTracker での細胞内酸性オルガネラの染色について、有意な差は見られなかった。
- (下) siRNA トランスフェクション細胞を LysoTracker で染色しファゴサイトーシスさせて形成したファゴソームについて、LysoTracker で染色されているファゴソームの割合をそれぞれの時間で計測した。SNAP-23 の発現を抑制すると LysoTracker で染色されたファゴソームの割合が減少した。

ファゴソーム - ライソゾーム融合は抑制された

ファゴソームは形成後、エンドソームやライソゾームと融合を繰り返してファゴライソゾームへと成熟する。そこで、SNAP-23 の発現抑制がファゴソームとライソゾームとの融合に及ぼす影響について検証した。このために本実験では、赤色蛍光色素である rhodamine で標識された多糖類デキストラン (rhodamine B-conjugated dextran: RB-dextran) を用いた。RB-dextran はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、ライソゾームに蓄積する。成熟にともなってライソゾームと融合したファゴソームには RB-dextran が移行するため、顕微鏡観察下でファゴソーム内部に赤色シグナルを観察できる。siRNA をトランスフェクションした J774 細胞について RB-dextran によりライソゾームを染色し、その細胞にラテックスビーズ (直径 3.0 μm) を取り込ませ、経過時間ごとの RB-dextran で染色されたファゴソームの割合を計測した (図 3-1-10-6)。

その結果、control siRNA をトランスフェクションした細胞では、15 分の段階で 60% 以上のファゴソームに赤色蛍光が見られたのに対し、SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞では 40%程度であり、30 分経過後もその傾向は維持されていた (図 3-1-10-7 : 下)。このことは、SNAP-23 の発現抑制によってファゴソーム - ライソゾーム融合が抑制されたことを示している。また、RB-dextran によるライソゾームの染色効率 (蛍光強度) は、siRNA をトランスフェクションした細胞間で差は見られなかった (図 3-1-10-7 : 上)。

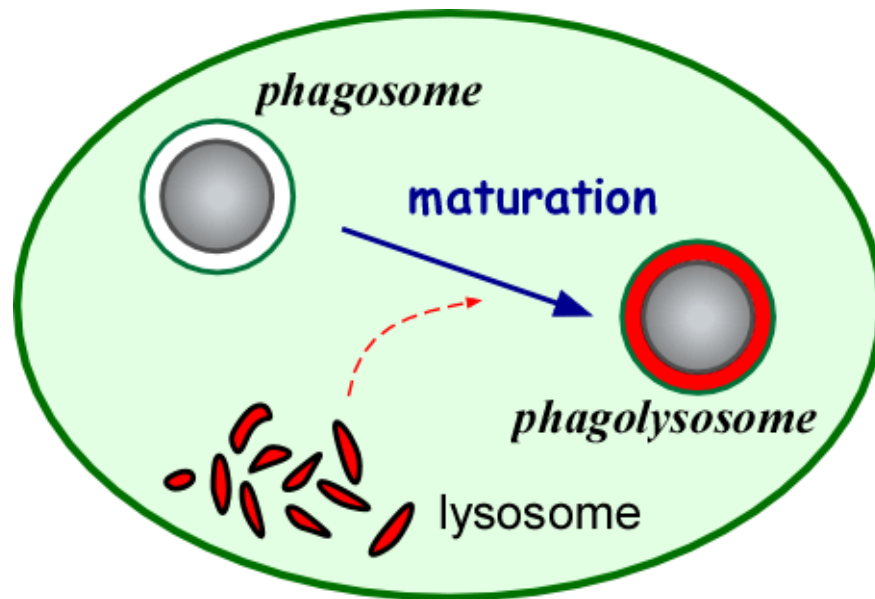


図 3-1-10-6. RB-dextran を用いたファゴソーム - ライソゾーム融合の解析の概略

RB-dextran はライソゾームを染色する。ファゴサイトーシスによって形成されたファゴソームは、成熟にともなってライソゾームと融合する。細胞にファゴサイトーシスさせて形成したファゴソームについて、RB-dextran で染色されていた割合を計測した。

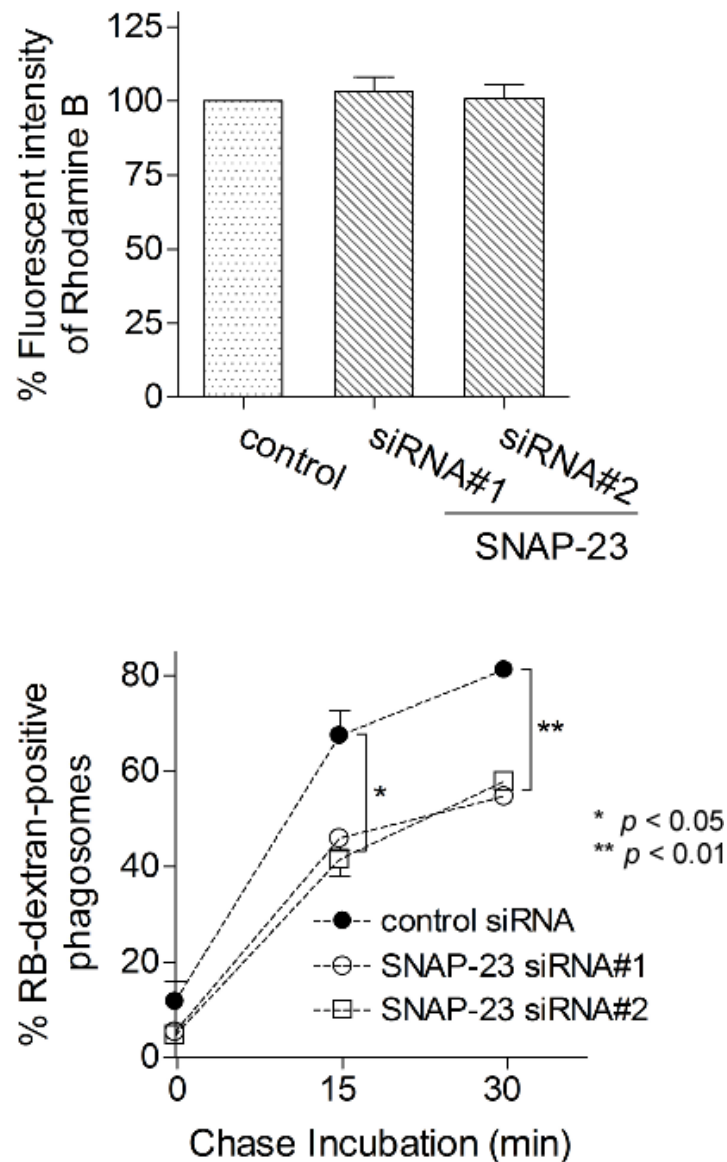


図 3-1-10-7. RB-dextran を用いたファゴソーム - ライソゾーム融合の解析

- (上) siRNA トランスフェクション後の RB-dextran でのライソゾームの染色について有意な差は見られなかった。
- (下) siRNA トランスフェクション細胞を RB-dextran で染色しファゴサイトーシスさせて形成したファゴソームについて、RB-dextran で染色されているファゴソームの割合をそれぞれの時間で計測した。SNAP-23 の発現を抑制すると RB-dextran で染色されたファゴソームの割合が減少した。

SNAP-23 抑制細胞において見られたファゴソーム成熟過程の遅延は

SNAP-23 の過剰発現により回復した

これまでの研究から、SNAP-23 の発現抑制によりファゴソームの成熟化が抑制されることが明らかとなった。この抑制の効果が SNAP-23 に特異的であるかを検証するため、次の実験を行った。SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞に対し、一過的に SNAP-23 を過剰発現させてファゴソーム成熟に見られた遅延が回復するかを解析した。一過的に発現させる SNAP-23 の発現が siRNA によって抑制されないように、ここでは 5' 側非翻訳領域をターゲット配列とする SNAP-23 siRNA#2 を用いた。

実際には、control siRNA と SNAP-23 siRNA#2 をトランスフェクションした細胞を RB-dextran でライソゾームを染色し、コントロール細胞については mV を、SNAP-23 発現抑制細胞については mV, mV-S23, mV-S23 Δ C8 を一過的に過剰発現させた。これらの細胞について RB-dextran を用いたファゴソーム - ライソゾーム融合の解析を行い、RB-dextran で染色されたファゴソームの割合を調べた。

その結果、SNAP-23 siRNA#2 トランスフェクション細胞に mV-S23 を過剰発現することで、control siRNA トランスフェクション細胞に mV を過剰発現させた場合と同程度にまで RB-dextran で染色されたファゴソームの割合が回復した。SNAP-23 siRNA#2 トランスフェクション細胞に mV-S23 Δ C8 を過剰発現させた場合、mV-S23 の過剰発現の場合ほどではないが mV 発現よりも有意に RB-dextran 染色のファゴソームの割合が回復した (図 3-1-10-8)。

また、同様に LysoTracker を用いてファゴソーム酸性化への効果を調べたところ、RB-dextran の場合と同じように mV-S23 の過剰発現で抑制効果が回復した (図 3-1-10-9)。これらのことから、SNAP-23 を発現抑制した場合に見られたファゴソーム成熟の抑制は、SNAP-23 特異的であると確認できた。

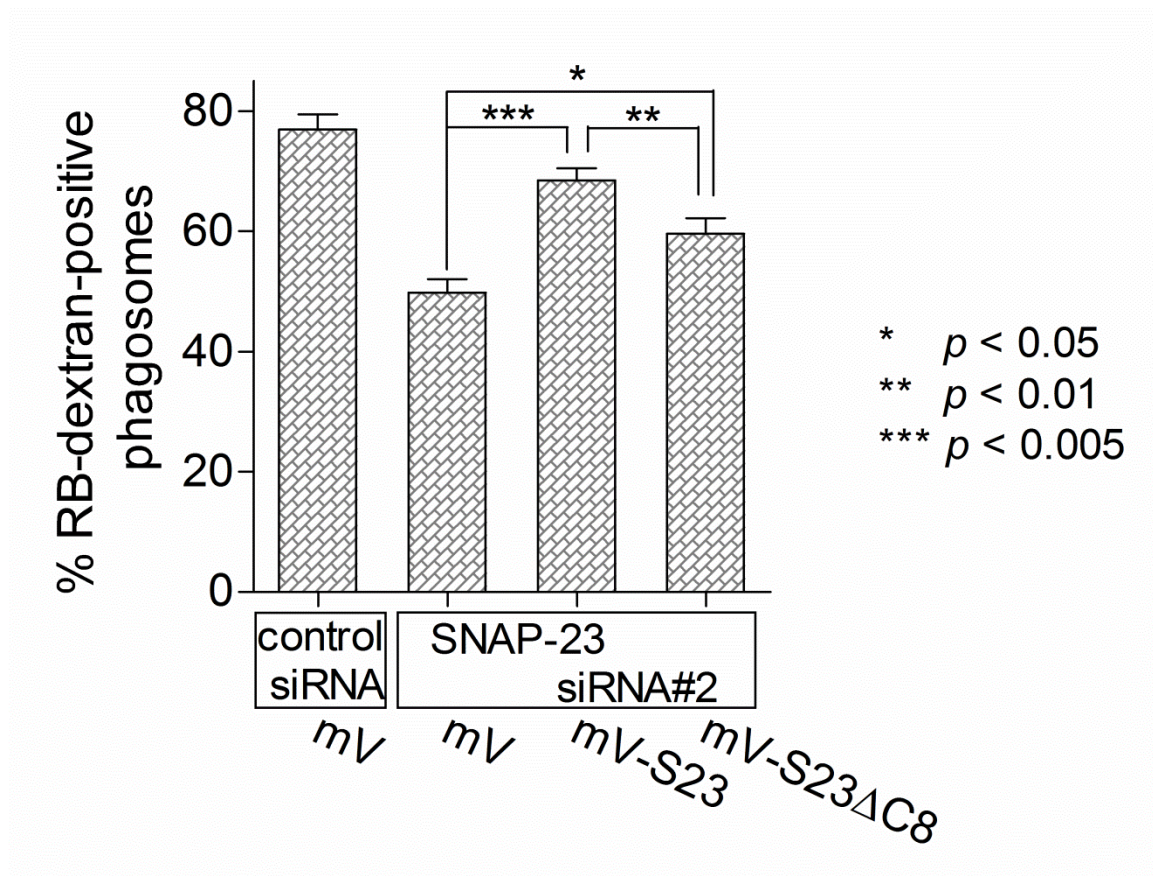


図 3-1-10-8. ファゴソーム成熟における RB-dextran を用いた SNAP-23 の機能回復実験

SNAP-23 の発現を抑制した細胞に一過的に mV-S23 を過剰発現させると、ファゴソーム - ライソゾーム融合における機能が回復した。mV-S23ΔC8 の過剰発現の場合も、小さいながら回復が見られた。

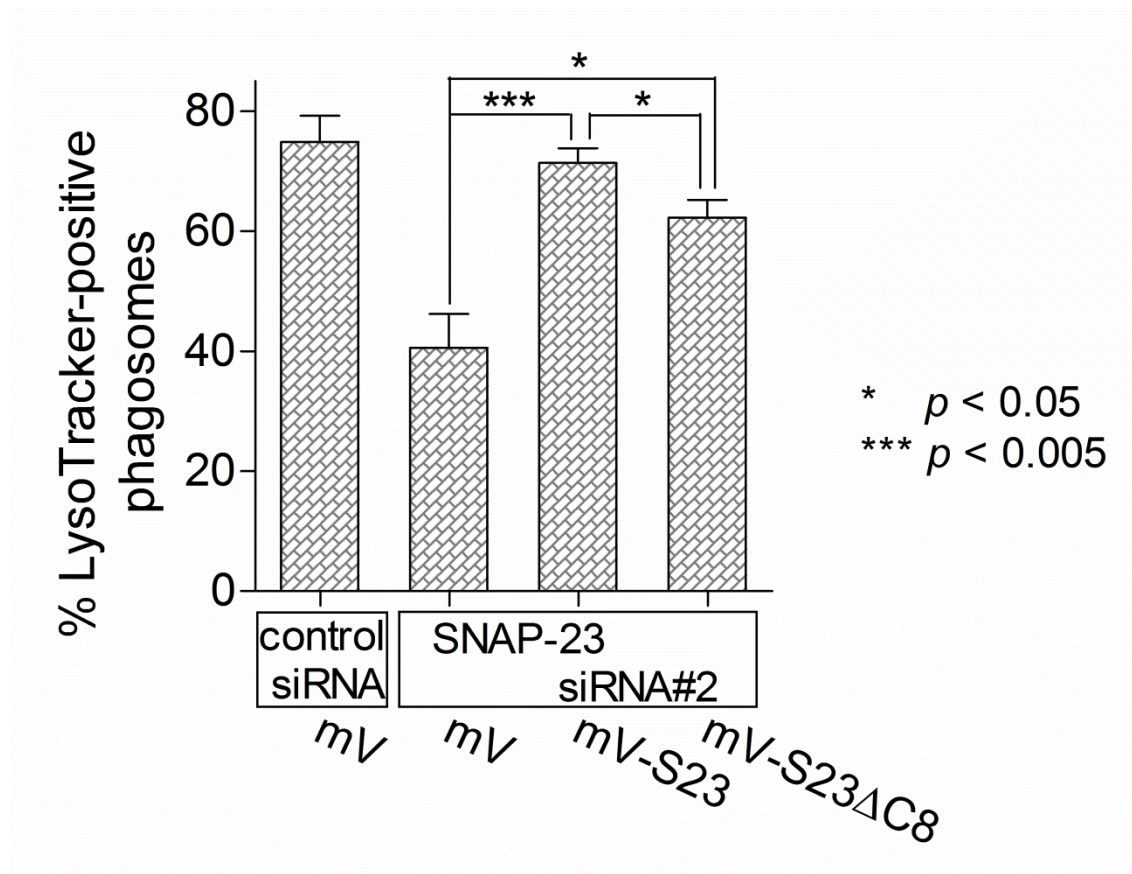


図 3-1-10-9. ファゴソーム成熟における LysoTracker を用いた SNAP-23 の機能回復実験

SNAP-23 の発現を抑制した細胞に一過的に mV-S23 を過剰発現させると、ファゴソーム内部の酸性化における機能が回復した。mV-S23ΔC8 の過剰発現の場合も、ある程度の回復が見られた。

3.1.11 SNAP-23 の分子内 FRET 解析

SNAP-23 の FRET プローブ作製

SNAP-23 は膜融合にともなう複合体形成時などに分子内の二つの SNARE モチーフが非常に近づくように立体構造を大きく変える。SNAP-23 が実際に膜上で機能していることを証明するためには、この立体構造の変化を追跡することが重要になると考え、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer : FRET) を利用した解析を行った。FRET とは二つの蛍光分子が非常に近接した場合にエネルギーの移動が起こる現象である。一方の蛍光分子 (ドナー) で励起されたエネルギーが他方の蛍光分子 (アクセプター) に移動することでアクセプター分子が励起されて蛍光を発する。この転移効率は距離の 6 乗に反比例するので、蛍光基の距離に関して正確な情報を得ることができる。SNAP-23 の二つの SNARE モチーフが近接する別々の部位に二色の蛍光分子を挿入した分子内 FRET プローブを作製し、細胞内で FRET シグナルが確認できれば SNAP-23 が膜融合に機能していることが証明できると考えた。これまでに SNAP-23 と同じファミリーである SNAP-25 では、その分子内に異なる二色の蛍光タンパク質を挿入することでエキソサイトーシスにおける分子内 FRET 解析が行われている^[36, 37]。そこで SNAP-23 でも同様の方法を用いることで、ファゴソーム膜上における立体構造の変化をモニターできると考えた。

本実験でははじめに、SNAP-25 で行われている FRET 解析で用いられている FRET プローブを基に、SNAP-23 分子内の二箇所の SNARE モチーフ (SN1, SN2) それぞれの N 末側に二色の蛍光タンパク質 (TagGFPAC11, TagRFP) を挿入した SNAP-23 の分子内 FRET プローブ (TagGFPAC11-SN1-TagRFP-SN2 : tG-S1-tR-S2) を作製した (図 3-1-11-1)。SNAP-23 の立体構造変化にともない二つの SNARE モチーフが近づいたときに、挿入した二色の蛍光タンパク質も非常に近づく (図 3-1-11-1 : 右) ため FRET 解析が可能と期待できる。また、ネガティブコントロールとして、TagRFP を SN2 の C 末側に挿入した

プローブ (TagGFPΔC11-SN1-SN2-TagRFP : tG-S1-S2-tR) と、SN1 の N 末側に TagGFPΔC11 のみを挿入したプローブ (TagGFPΔC11-SN1-SN2 : tG-S1-S2)、SN2 の C 末側に TagRFP のみを挿入し Myc タグを付加したプローブ (Myc-S1-S2-TagRFP : Myc-S1-S2-tR) を作製した。作製した SNAP-23 の FRET プローブを J774 細胞に一過的に発現させ、ビーズをファゴサイトーシスさせた状態を超解像顕微鏡で観察すると、内在性 SNAP-23 と同様に細胞膜上とファゴソーム膜上に局在することが確認できた (図 3-1-11-2)。これら SNAP-23 の FRET プローブを用いて FRET 解析を行った。

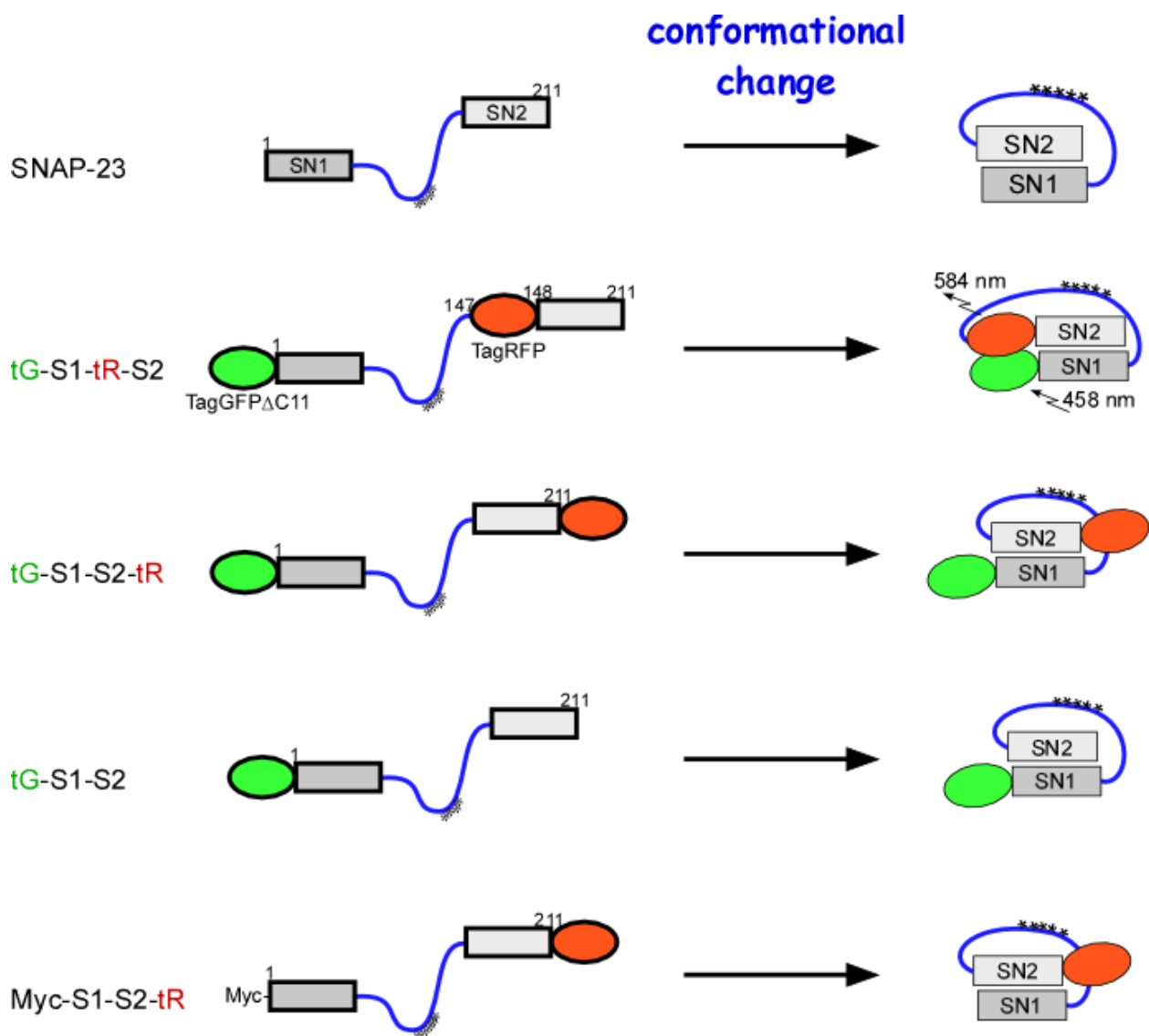


図 3-1-11-1. SNAP-23 の分子内 FRET プローブ模式図

- (左) SNAP-23 の分子内に二色もしくは一色の蛍光タンパク質を挿入した。
- (右) SNAP-23 は構造変化を起こすと分子内の二つの SNARE モチーフが非常に近づく状態となる。このとき、tG-S1-tR-S2 は二色の蛍光タンパク質が近接するが、tG-S1-S2-tR は離れた状態となる。

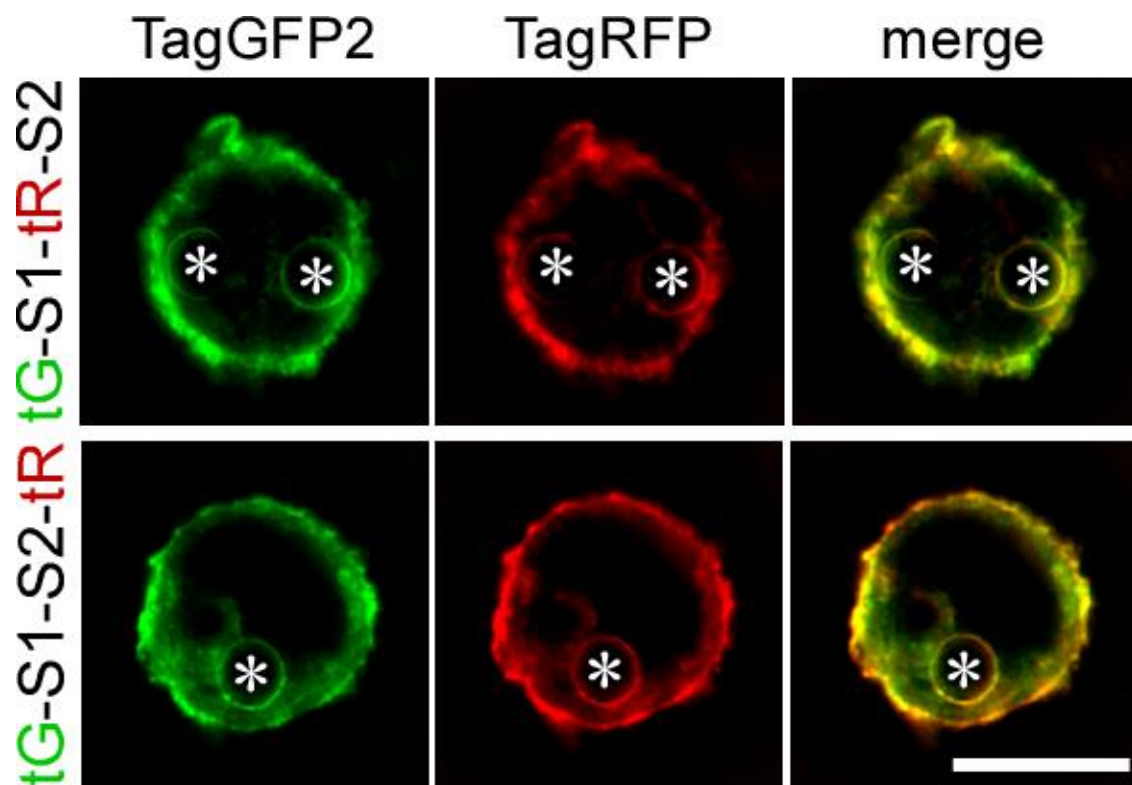


図 3-1-11-2. SNAP-23 の分子内 FRET プローブの細胞内局在

tG-S1-tR-S2 および tG-S1-S2-tR を J774 細胞に一過的に過剰発現させ超解像顕微鏡でその局在を確認すると、内在性 SNAP-23 と同様に細胞膜とファゴソーム膜上に局在した。

細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析

作製した SNAP-23 の FRET プローブにより FRET 解析が可能であることを確認するため、はじめに細胞膜上での FRET 解析を行った。実際の解析では、ドナー分子である TagGFPΔC11 からアクセプター分子である TagRFP へのエネルギー移動の効率 (FRET 効率) を定量化するため、FRET プローブの蛍光波長スペクトルを測定した (図 3-1-11-5)。FRET 効率は TagGFP の蛍光波長である 505 nm と TagRFP の蛍光波長である 580 nm のスペクトルの比 (580/505 nm) で表した。

SNAP-23 の FRET プローブ (tG-S1-tR-S2) と Myc タグを付加した細胞膜局在の SNARE タンパク質 Myc-syntaxin3 (Myc-syx3), Myc-syntaxin4 (Myc-syx4), Myc-syntaxin11 (Myc-syx11), Myc-VAMP5 (図 3-1-11-3) を一過的に共発現させ細胞膜上の FRET 解析を行ったところ、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 の組合せでの共発現によってのみ、コントロールである tG-S1-tR-S2+Myc-vector の組合せでの共発現の場合に比べて FRET シグナルの上昇が観察できた (図 3-1-11-6)。

そこで次に、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 とこれら Myc-syx3, Myc-syx4, Myc-syx11 の共発現による SNAP-23 の FRET シグナルの変化を調べたところ、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5+Myc-syx3 の組合せでは、さらに顕著な FRET シグナルの増加が見られた (図 3-1-11-7)。この組合せについて tG-S1-S2-tR や tG-S1-S2+Myc-S1-S2-tR のプローブを用いた場合には、FRET シグナルの増加は観察されなかったことから、tG-S1-tR-S2 を用いた FRET 解析が可能であることが確認できた。

一方、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5+Myc-syx4, tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5+Myc-syx11 といった組合せでは、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 の組合せの場合に観察された FRET シグナル (図 3-1-11-6) よりも減少しコントロールと同程度だった (図 3-1-11-7)。また、Myc タグを付加したエンドソーム・ライソゾーム局在 SNARE タンパク質 Myc-VAMP3, Myc-VAMP7, Myc-VAMP8 (図 3-1-11-4) と tG-S1-tR-S2 との共発現では、FRET シグナルの上昇は見られなかった (図 3-1-11-8)。これらの結果から、SNAP-23 は細胞膜上で構

造変化を起こすこと、つまり膜融合に機能し得ることが明らかとなった。

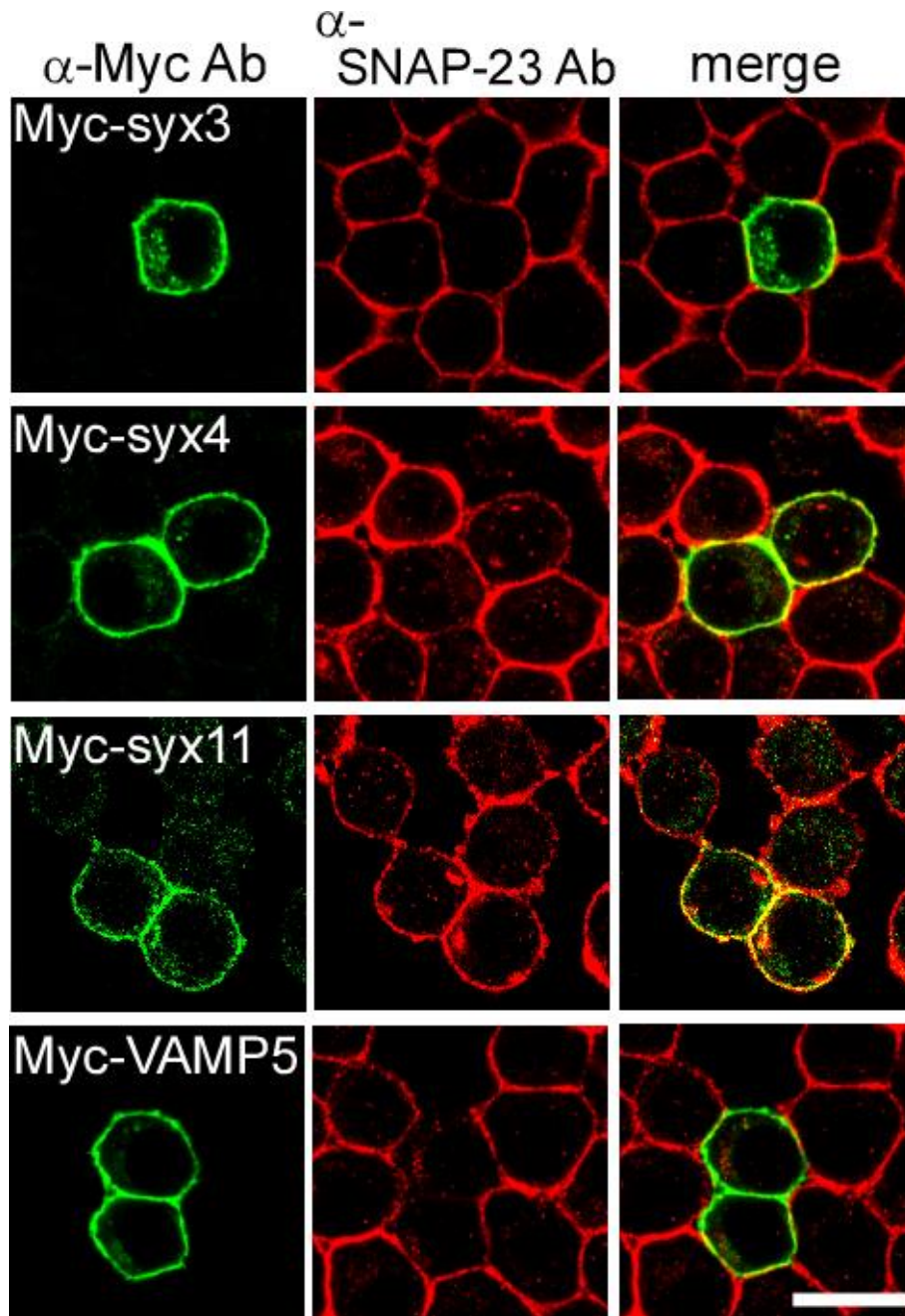


図 3-1-11-3. Myc タグを付加した SNARE タンパク質の局在 (1)

Myc タグを付加した syx3, syx4, syx11, VAMP5 を J774 細胞にトランスフェクションし、抗 Myc 抗体と Alexa 488 標識二次抗体、抗 SNAP-23 抗体と Alexa 594 標識二次抗体により免疫染色した。いずれも、細胞膜に局在することが確認できた。Bar, 10 μ m

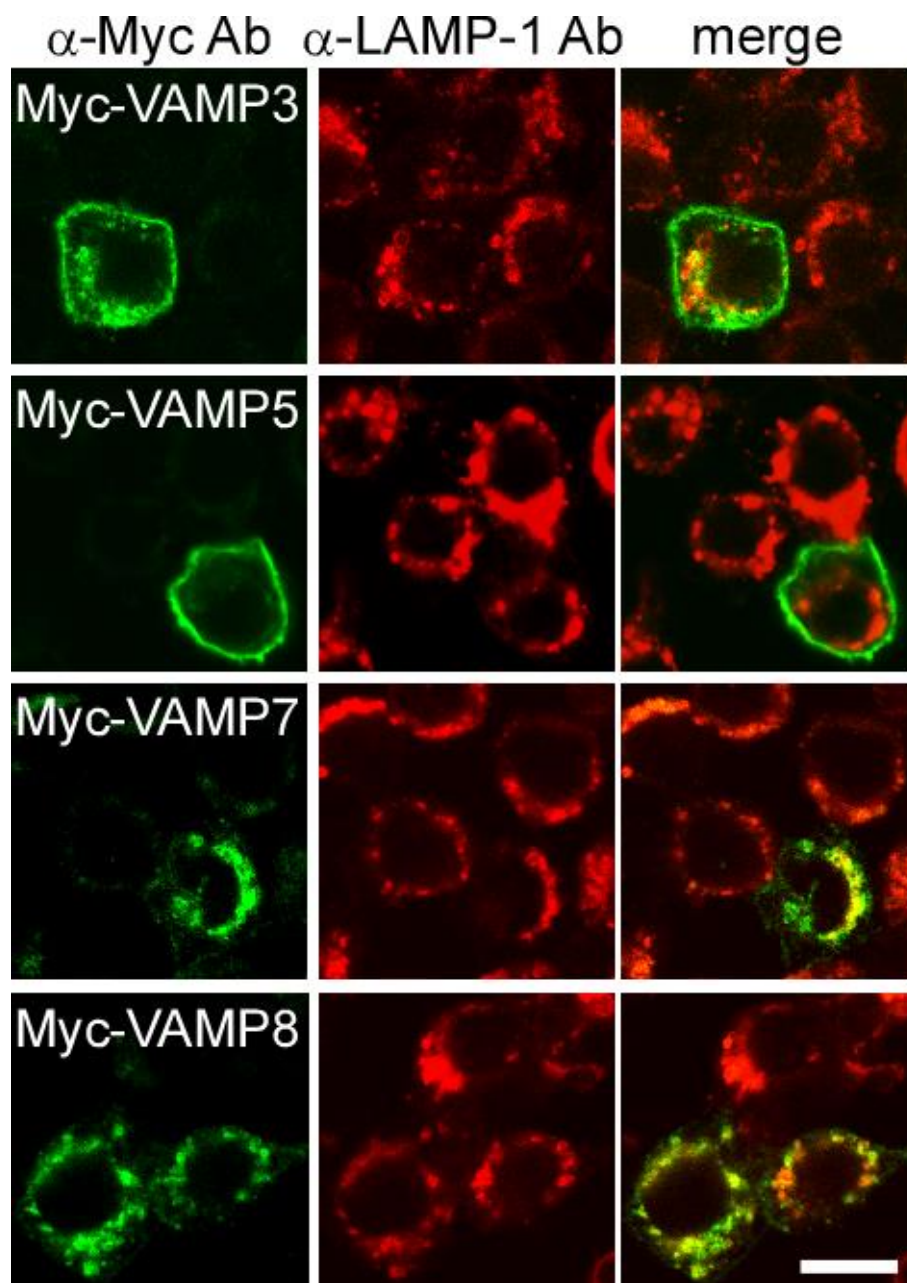


図 3-1-11-4. Myc タグを付加した SNARE タンパク質の局在 (2)

Myc タグを付加した VAMP3, VAMP5, VAMP7, VAMP8 を J774 細胞にトランスフェクションし、抗 Myc 抗体と Alexa 488 標識二次抗体、抗 LAMP-1 抗体と Alexa 594 標識二次抗体により免疫染色した。VAMP3, VAMP7, VAMP8 がエンドソーム・ライソゾームに局在することが確認できた。Bar, 10 μ m

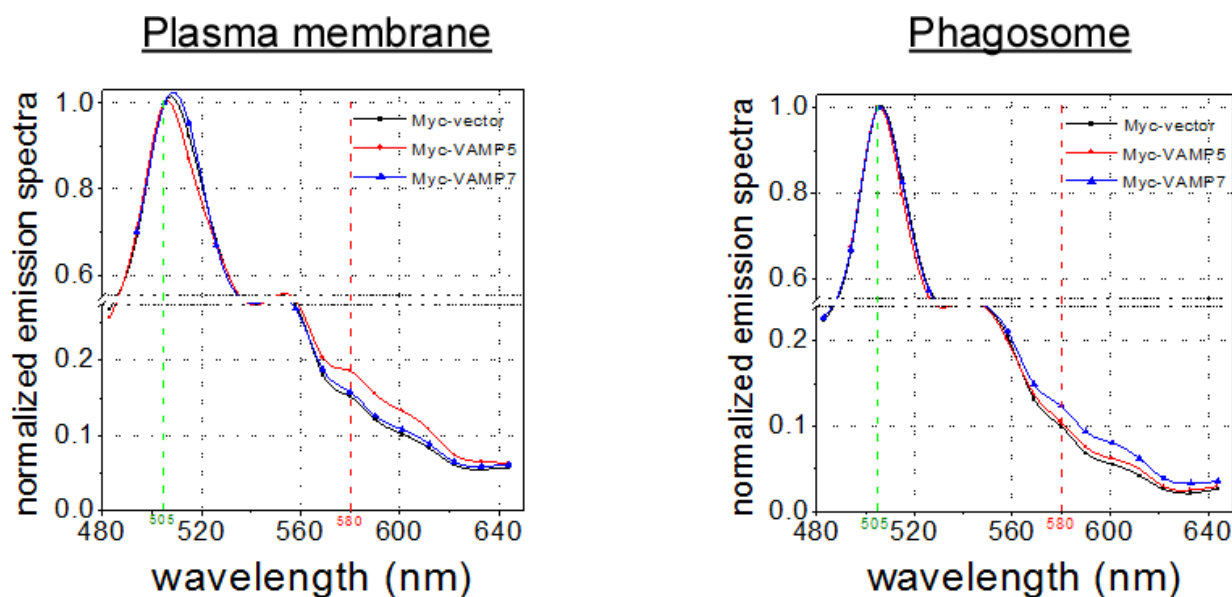


図 3-1-11-5. **tG-S1-tR-S2** を用いた蛍光波長スペクトルの計測

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector, Myc-VAMP5, Myc-VAMP7 を J774 細胞に一過的に過剰発現させ共焦点顕微鏡を用いて **tG-S1-tR-S2** の蛍光波長スペクトルを計測し、ドナー分子 (**TagGFPΔC11**) の蛍光波長である 505 nm を基準に標準化した。これにより、FRET が起きていればアクセプター分子 (**TagRFP**) の蛍光波長である 580 nm 付近で蛍光の増加が見られる。細胞膜上では **tG-S1-tR-S2**+Myc-VAMP5 で (図 3-1-11-6)、ファゴソーム膜上では **tG-S1-tR-S2**+Myc-VAMP7 の組合せで (図 3-1-11-9) FRET シグナルの上昇が観察された。

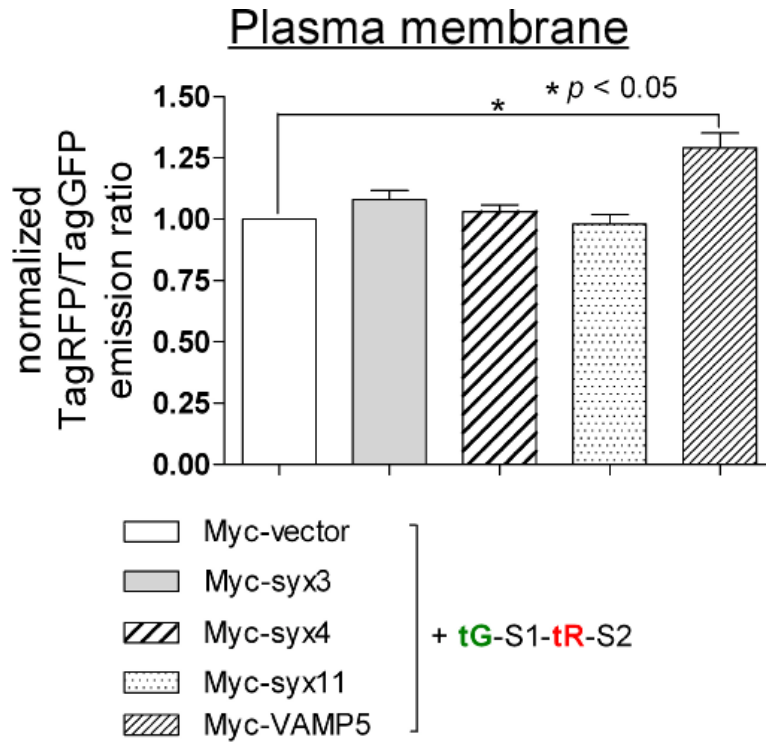


図 3-1-11-6. 細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (1)

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector, Myc-syx3, Myc-syx4, Myc-syx11, Myc-VAMP5 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2 と Myc-VAMP5 とを共発現させた場合に FRET 効率の上昇が見られた。

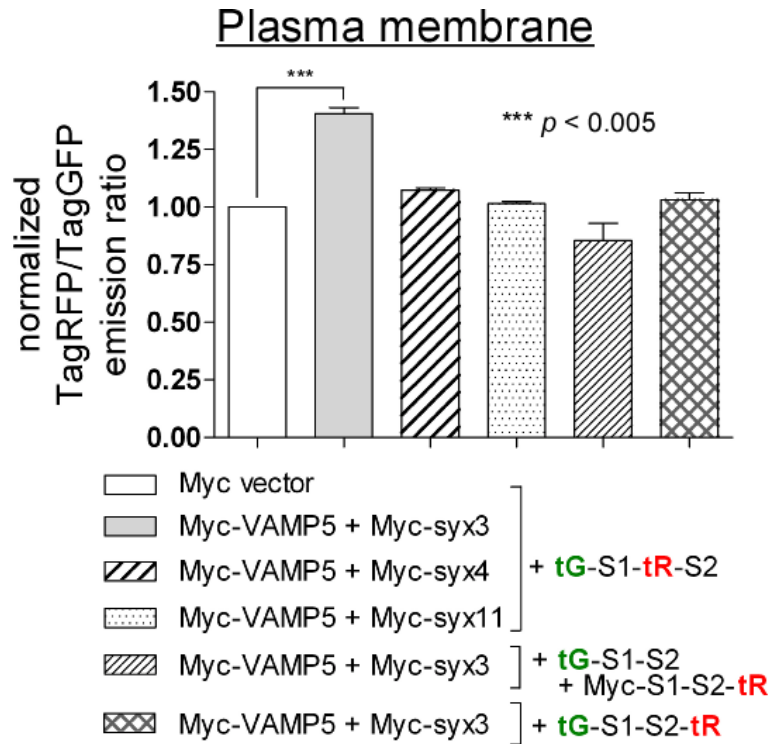


図 3-1-11-7. 細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (2)

tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 に加えて Myc-syx3, Myc-syx4, Myc-syx11 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5+Myc-syx3 の組合せで共発現させた場合に、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 の場合よりもさらに顕著な FRET 効率の上昇が見られた。一方、tG-S1-S2-tR や tG-S1-S2+Myc-S1-S2-tR のプローブを用いた場合、FRET シグナルの上昇は確認できなかった。

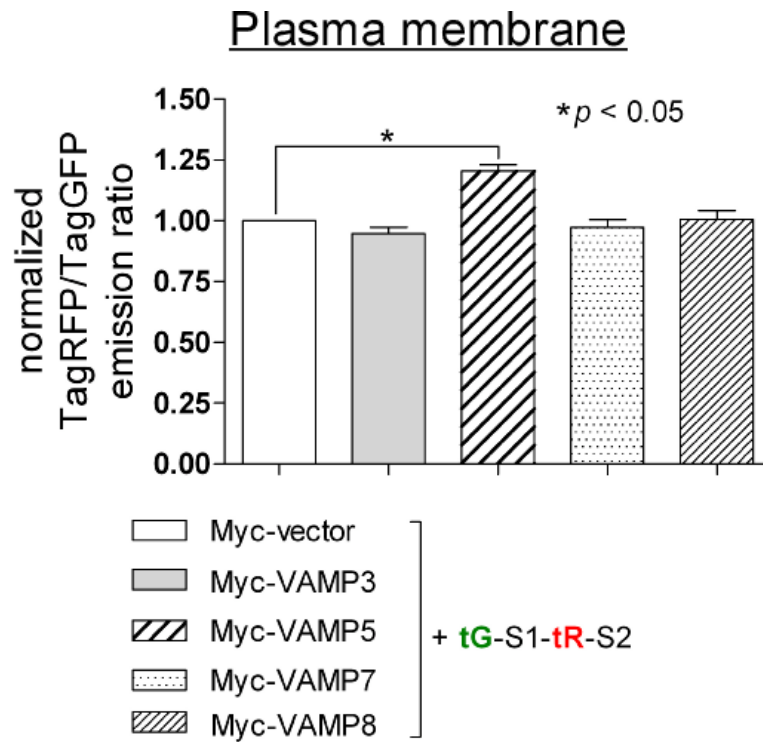


図 3-1-11-8. 細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (3)

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector , Myc-VAMP3, Myc-VAMP7, Myc-VAMP8 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP5 以外の組合せで FRET シグナルの上昇が見られたものはなかった。

ファゴソーム膜上での SNAP-23 の FRET 解析

次に、ファゴソーム膜上で SNAP-23 が膜融合活性につながる構造変化を起こすかを調べるため、ファゴソーム膜上での FRET 解析を行った。ファゴソーム形成のために、ここでは IgG でオプソニン化したザイモサンを細胞に与えた。

エンドソーム・ライソゾーム局在の SNARE タンパク質のうち、免疫沈降実験（図 3-1-6-1）で mV-S23 細胞と mV-S23 Δ C8 細胞とで顕著な差が見られた VAMP3 と VAMP7 について FRET 解析を行ったところ、tG-S1-tR-S2+Myc-VAMP7 の組合せのときに FRET シグナルは上昇し、一方、tG-S1-S2-tR+Myc-VAMP7 の組合せではシグナルの上昇は確認できなかった（図 3-1-11-9）。このことは、SNAP-23 がファゴソーム膜上で構造変化を起こし、膜融合に関与することを示唆している。また、細胞膜上で FRET シグナルの上昇が観察された tG-S1-S2-tR+Myc-VAMP5 の組合せの場合は、ファゴソーム膜上でのシグナル上昇が見られなかった（図 3-1-11-10）。

以上の結果から、SNAP-23 はファゴサイトーシスにおけるファゴソームの形成と成熟の両過程について、促進的に機能していることが明らかとなった。

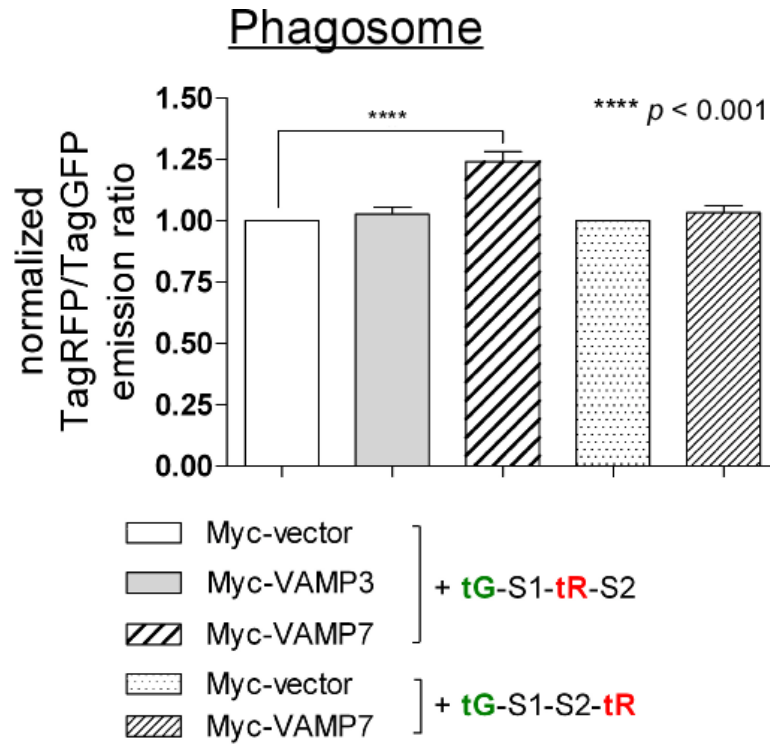


図 3-1-11-9. ファゴソーム膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (1)

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector , Myc-VAMP3, Myc-VAMP7 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2 +Myc-VAMP7 の組合せで FRET シグナルの上昇が見られた。

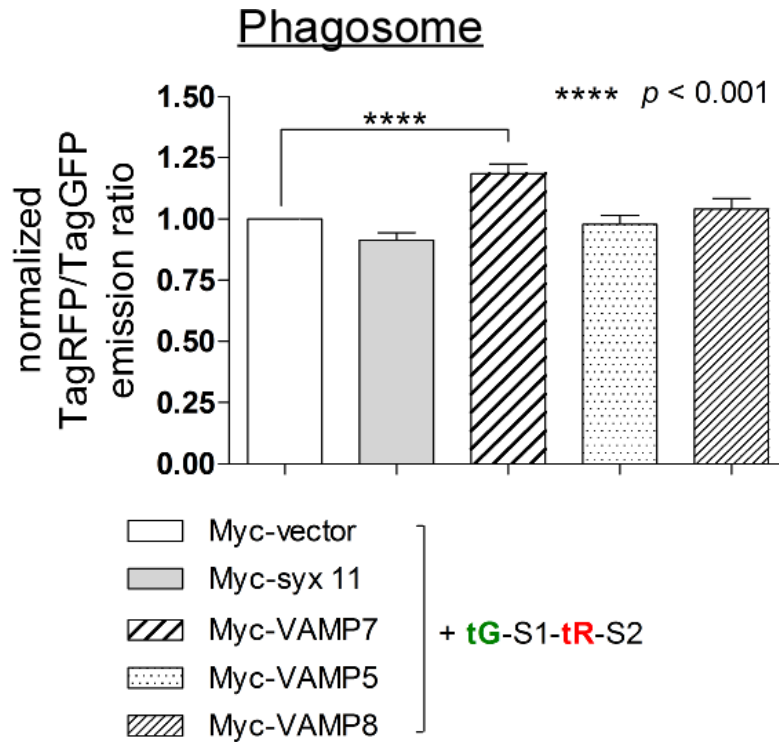


図 3-1-11-10. ファゴソーム膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (2)

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector , Myc-syx11, Myc-VAMP7, Myc-VAMP5, Myc-VAMP8 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。細胞膜上で FRET シグナルの上昇が見られた tG-S1-tR-S2 + Myc-VAMP5 の組合せは、ファゴソーム膜上ではシグナルの上昇が見られなかった。

3.2 SNAP-23 のリン酸化がファゴサイトーシスへ及ぼす影響の 検証

3.2.1 mVenus-SNAP-23 変異体を過剰発現したマクロファージの作製

マクロファージにおいて SNAP-23 の Ser95 はリン酸化された

これまでに行った研究から、SNAP-23 がファゴサイトーシスにおけるファゴソームの形成および成熟に機能することが明らかとなった。このように、ファゴサイトーシスの一連の過程において複数のステップで機能する SNAP-23 の機能はどのように制御されているのであろうか。それを調べるため、SNAP-23 のリン酸化に着目してファゴサイトーシスに及ぼす影響を検証した。

これまでに、精製ファゴソームのプロテオーム解析により、ファゴソーム上にはリン酸化された SNAP-23 が存在することが明らかになっている^[3]。また、肥満細胞や血小板では SNAP-23 がリン酸化されてエキソサイトーシスに機能するといった報告もあり^[38]、SNAP-23 のリン酸化がファゴソームの形成や成熟における機能と関連する可能性が予想された。そこで、報告がある SNAP-23 のリン酸化部位のうち、種間で保存されている 95 番目のセリン残基 (Ser95) に着目した。

はじめに、マクロファージにおいて SNAP-23 の Ser95 がリン酸化されるかを確認した。PMA は、セリン残基およびスレオニン残基をリン酸化する酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することが知られており、また SNAP-23 の関与する細胞膜上での NOX2 複合体を活性化する。この PMA で処理した J774 細胞の細胞抽出液について Western blot 解析を行った (図 3-2-1-1)。

PMA 処理後、経過時間ごとに細胞抽出液を調製し抗 SNAP-23 抗体で調べた結果、5

分経過後以降では、0 分の段階では見られなかったリン酸化による修飾の影響と思われるバンドシフトが確認できた。また、SNAP-23 Ser95 のリン酸化特異的な抗体 (α -phospho Ser⁹⁵ Ab) を用いて確認したところ、PMA 処理後には 25 kDa 付近にバンドが検出できた。これらのことから、マクロファージにおいても内在性 SNAP-23 の Ser95 がリン酸化され得ることがわかった。

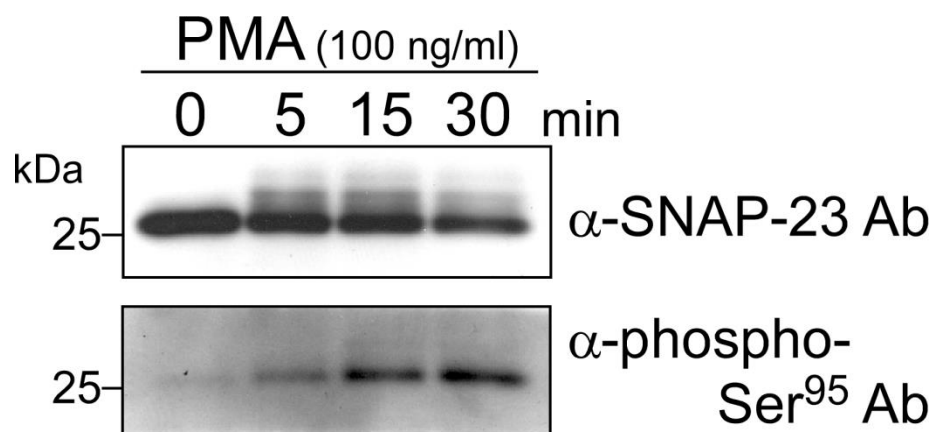


図 3-2-1-1. Western blot 解析によるマクロファージにおける内在性 SNAP-23 Ser95 リン酸化の確認

J774 細胞を PMA 処理し、経過時間ごとの細胞抽出液を調製して Western blot 解析を行った結果。5 分経過後から抗 SNAP-23 抗体では内在性 SNAP-23 のバンドシフトが見られた。また、抗 SNAP-23 Ser95 リン酸化抗体を用いると、SNAP-23 の Ser95 がリン酸化される様子を確認できた。

mVenus-SNAP-23 変異体の安定発現株の樹立

マクロファージにおいても SNAP-23 の Ser95 がリン酸化されることが確認できた（図 3-2-1-1）。そこで、このリン酸化がファゴサイトーシスに及ぼす影響を検証するために、SNAP-23 の 95 番目のセリンをアラニン残基（SNAP-23 S95A）とアスパラギン酸残基（SNAP-23 S95D）に置換した変異体を作製した。アラニン残基はリン酸化のターゲットにならないため、この置換により 95 番目のアミノ酸にはリン酸化が起きない。また、セリンはリン酸化されると負のチャージが付加されるが、これを酸性アミノ酸であるアスパラギン酸に置換することでリン酸化状態を模倣することができる。これら SNAP-23 変異体それぞれの N 末端側に mVenus を付加させたもの（mVenus-SNAP-23 S95A : mV-S23 S95A, mVenus-SNAP-23 S95D : mV-S23 S95D）を作製し（図 3-2-1-2）、これらを安定発現する J774 細胞株を樹立した。

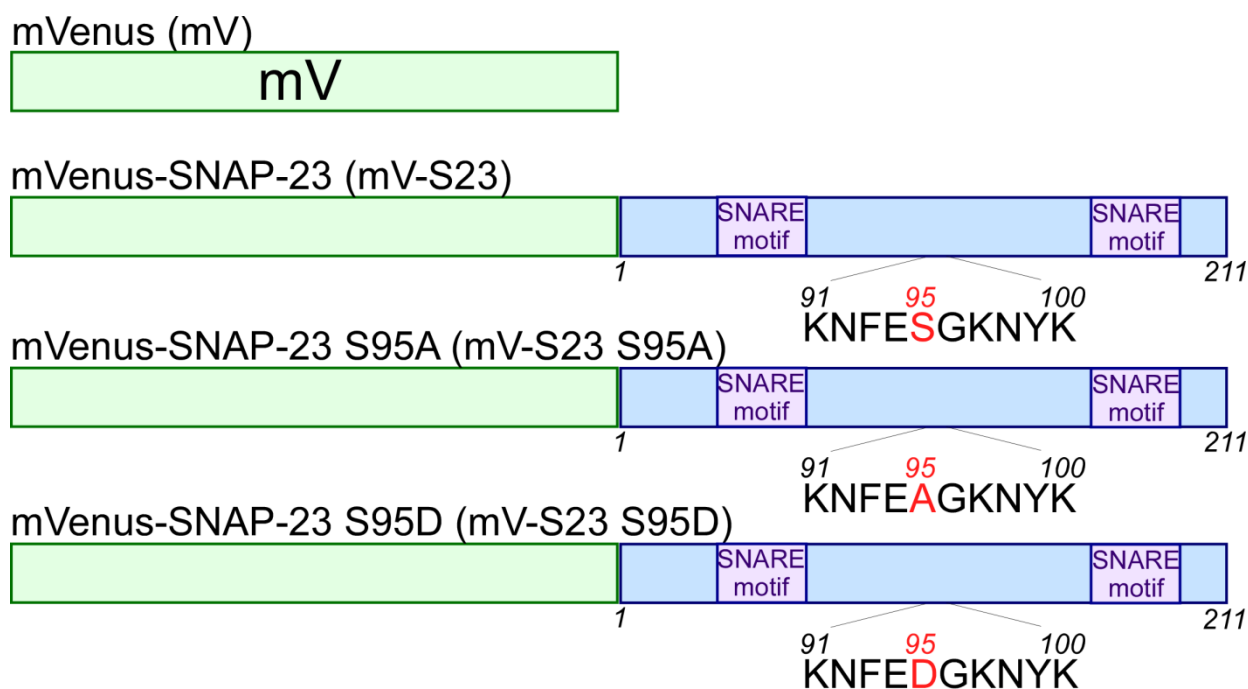


図 3-2-1-2. 黄色蛍光タンパク質（mVenus）を付加した SNAP-23 変異体

SNAP-23 の 95 番目のセリンをアラニン残基（A）およびアスパラギン酸残基（D）に置換した変異体それぞれの N 末端に mVenus を付加し、融合タンパク質として安定発現する J774 細胞を樹立した。これにより SNAP-23 変異体の細胞内動態を可視化でき、過剰発現の効果を検証できる。

Western blot 法による mVenus 融合タンパク質の発現確認

これまでと同様に、作製した mVenus 融合タンパク質はレトロウイルスを用いてマクロファージ (J774 細胞) へ導入し、puromycin 耐性を指標に安定発現株を樹立し、それぞれを J774/mV, J774/mV-S23, J774/mV-S23 S95A, J774/mV-S23 S95D と呼ぶことにした。はじめに、これらの細胞株でのタンパク質の発現量を調べるために、それぞれの細胞抽出液について Western blot 法により解析した。

mVenus タンパク質を認識する抗 EGFP 抗体で調べた結果、約 25 kDa の位置に mV、約 50 kDa 付近に mV-S23, mV-S23 S95A, mV-S23 S95D の発現がシングルバンドとして確認でき、抗 SNAP-23 抗体を用いて約 25 kDa の内在性 SNAP-23 と比べると、いずれも約 2~3 倍程度の発現量だった。また、内在性タンパク質のコントロールとしては GAPDH を用いた (図 3-2-1-3)。これらの結果から、目的の mVenus 融合タンパク質が安定に発現していることが確認できた。

次に、これらの安定発現株に対し PMA 処理を行った場合について Western blot 解析を行った。抗 SNAP-23 Ser95 リン酸化抗体を用いて約 50 kDa の mVenus 融合タンパク質の発現を確認すると、野生型の SNAP-23 を安定発現させた J774/mV-S23 でのみバンドが検出でき、J774/mV-S23 S95A や J774/mV-S23 S95D では検出できなかった (図 3-2-1-4)。このことは、SNAP-23 の Ser95 をアラニン残基やアスパラギン酸残基に置換したため、mV-S23 S95A 細胞や mV-S23 S95D 細胞では PMA によるリン酸化が起きていないことを示すと同時に、用いた抗体の特異性も確認できた。

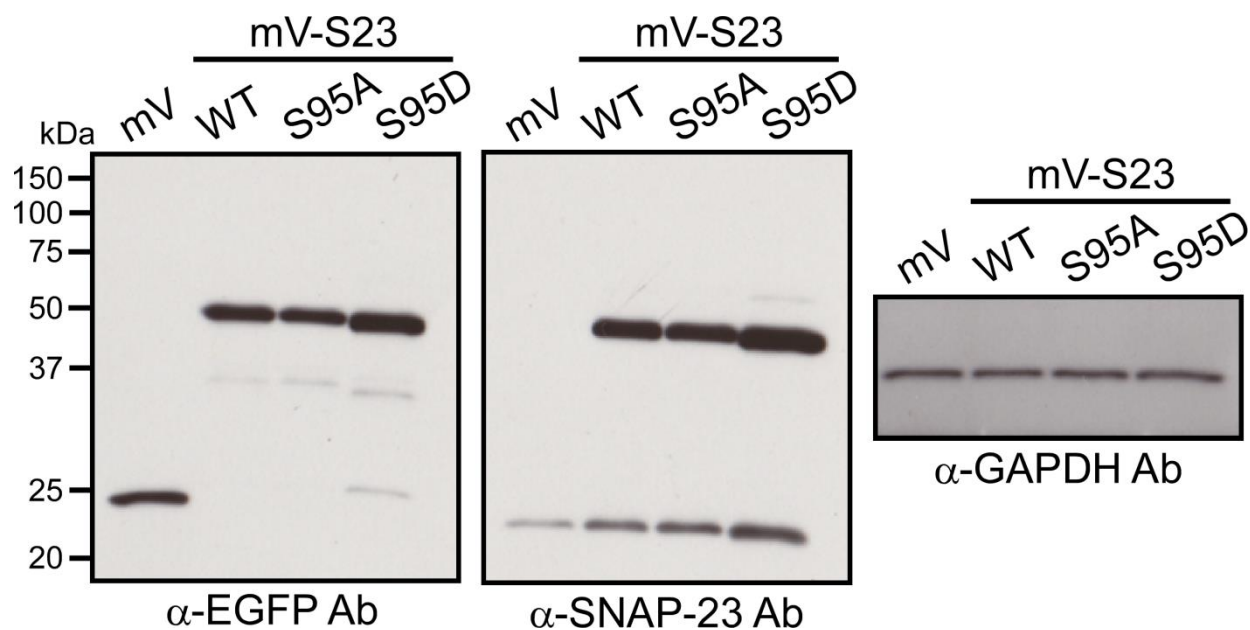


図 3-2-1-3. Western blot 解析による発現確認

- (左) 抗 EGFP 抗体による mVenus 融合タンパク質の確認。約 25 kDa の位置に mV の発現が、約 50 kDa の位置に mV-S23, mV-S23 S95A, mV-S23 S95D の発現が確認できた。
- (中) 抗 SNAP-23 抗体により、内在性の SNAP-23 (約 25 kDa) と発現させた mV-S23, mV-S23 S95A, mV-S23 S95D (約 50 kDa) が確認できた。
- (右) 抗 GAPDH 抗体での発現を調べたところ、どれも同程度の発現量だった。

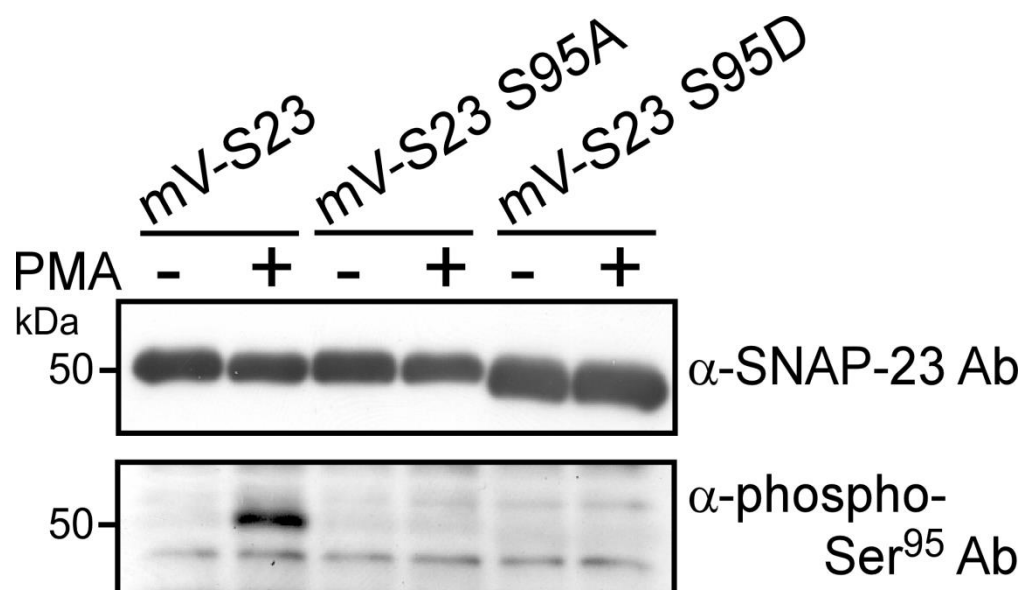


図 3-2-1-4. Western blot 解析による発現確認 (PMA 処理)

- (上) PMA 処理 (100 ng/ml, 15 分) を行った場合の抗 SNAP-23 抗体による mVenus 融合タンパク質の確認。
- (下) 抗 SNAP-23 Ser95 リン酸化抗体により、発現させた mVenus 融合タンパク質のうち野生型でのみ PMA によるリン酸化が起きていることを確認した。

顕微鏡による mVenus 融合タンパク質の細胞内局在の確認

作製した安定発現株における mV-S23 S95A と mV-S23 S95D について、共焦点顕微鏡により生きたままの状態の細胞内局在を確認した（図 3-2-1-5）。mV-S23 S95A と mV-S23 S95D は mV-S23 とよく似た局在を示し、内在性の SNAP-23 の局在（図 3-1-1-4）ともよく一致した。このことから、J774 細胞で過剰発現させた mVenus 融合タンパク質が異常な局在化をしていないことが確認できた。

また、ファゴサイトーシス時の mVenus 融合タンパク質の局在変化を調べるために Texas Red 標識ザイモサンをこれらの細胞と培養して共焦点顕微鏡で観察したところ、ファゴソーム膜上に局在化する様子が観察された（図 3-2-1-6）。これら mVenus を付加した SNAP-23 変異体の安定発現マクロファージを用い、ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 のリン酸化の影響について解析を行った。

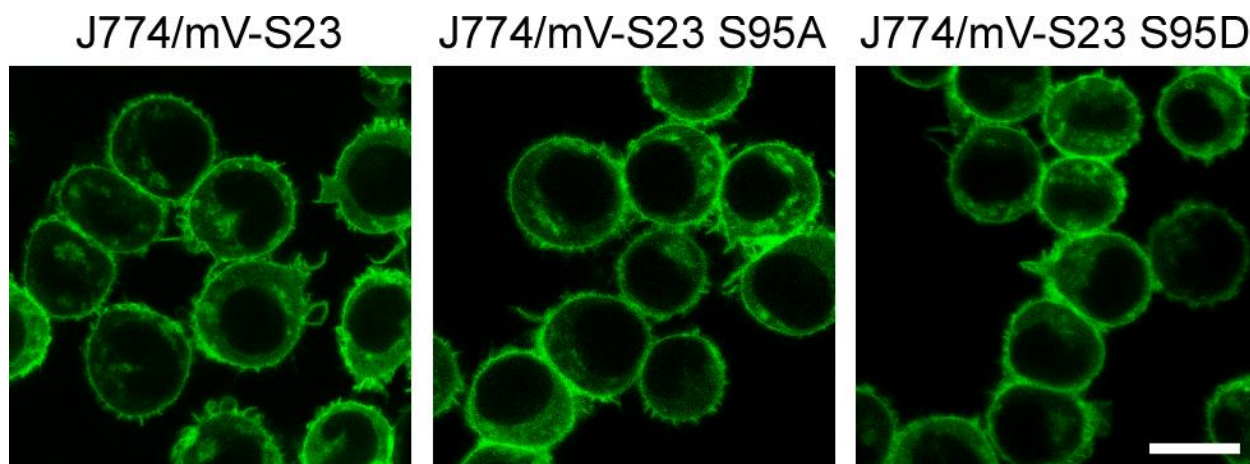


図 3-2-1-5. mVenus 融合タンパク質の細胞内局在

共焦点顕微鏡による J774/mV-S23, J774/mV-S23 S95A, J774/mV-S23 S95D の写真。それぞれの mVenus 融合タンパク質は細胞膜上に強い発現が見られた。Bar, 10 μ m

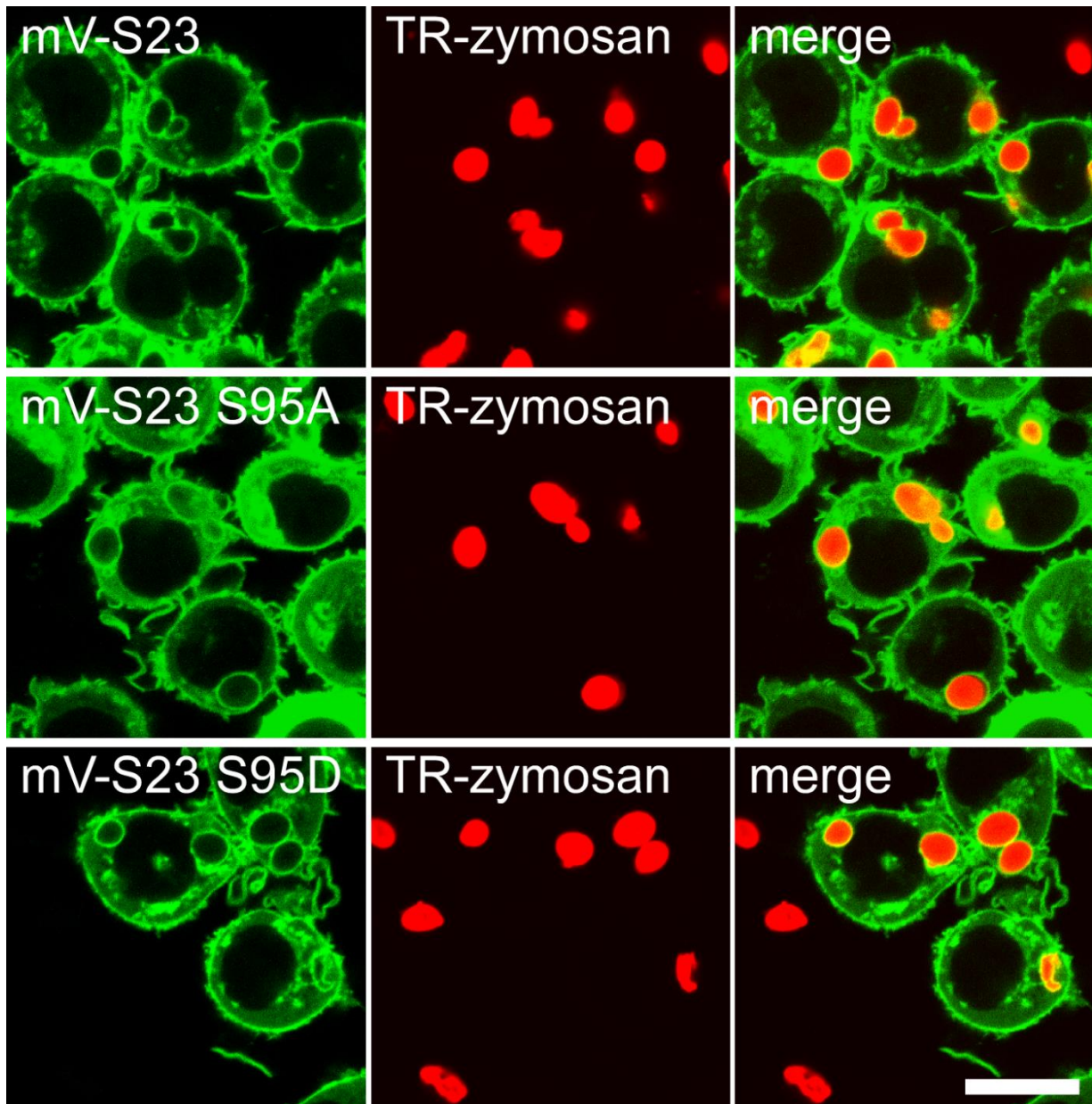


図 3-2-1-6. ザイモサンの細胞内への取り込み

mV-S23 細胞, mV-S23 S95A 細胞, mV-S23 S95D 細胞に Texas Red 標識ザイモサン (TR-zymosan) をファゴサイトーシスさせ 30 分後に撮影した共焦点顕微鏡写真。いずれの mVenus 融合タンパク質もファゴソーム膜上への局在化が見られた。Bar, 10 μ m

3.2.2 SNAP-23 のリン酸化がファゴソーム形成過程へ及ぼす影響についての検証

PMA 処理によりファゴサイトーシス効率は低下した

SNAP-23 の Ser95 がリン酸化される PMA で処理した場合の J774 細胞について、ファゴサイトーシス効率への影響を検証した。先述の通り、OFZ を用いた測定法では FITC がファゴソーム内部の酸性化の影響を受けファゴサイトーシス効率を正確に測定できなかったため、本実験では OTRZ を用いて測定した。PMA 処理に関しては、先に行った Western blot 解析の結果から処理後 15 分で十分なリン酸化が確認できたため（図 3-2-1-1）、今回の実験では 15 分の処理とした。その結果、PMA 処理を行った J774 細胞ではファゴサイトーシス効率が 20%程度減少していた（図 3-2-2-1：下）。OTRZ と細胞膜との結合効率に関しては、いずれの細胞も同程度であった（図 3-2-2-1：上）

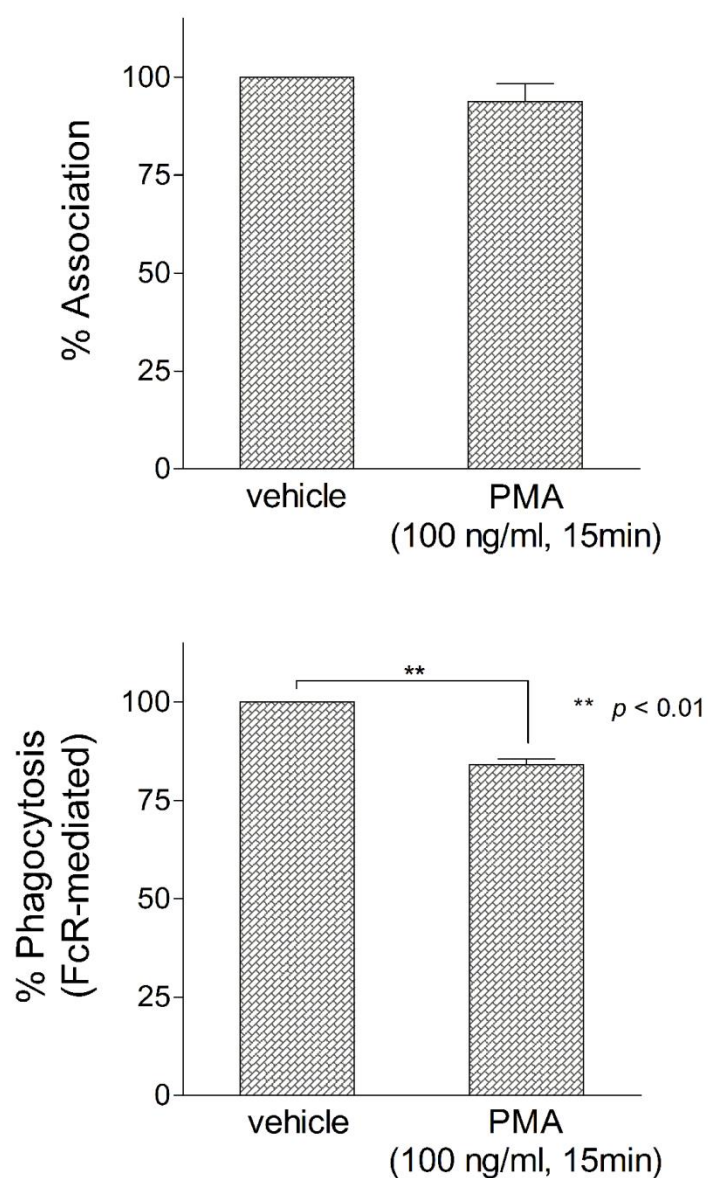


図 3-2-2-1. PMA 処理した J774 細胞におけるファゴサイトーシス効率の測定

- (上) PMA 処理を行った細胞でも OTRZ と細胞膜との接触効率に差はなかった。
- (下) PMA 未処理の細胞(vehicle)における OTRZ の取り込み量を 100%として PMA 処理細胞 (PMA) の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。PMA 処理を行うことで、ファゴサイトーシス効率は低下した。

mV-S23 S95D 細胞ではファゴサイトーシス効率が抑制された

次に、作製した mVenus 融合タンパク質の安定発現株を用いて、SNAP-23 Ser95 のリン酸化がファゴサイトーシス効率へ及ぼす影響について検証した。その結果、コントロールである mV 細胞に比べて、mV-S23 S95A 細胞では mV-S23 細胞と同程度取り込みが亢進されていた一方で、mV-S23 S95D 細胞では 75%程度に抑制されていた（図 3-2-2-2 : 下）。これらの結果から、SNAP-23 Ser95 のリン酸化によりファゴサイトーシス効率が低下することが示唆された。

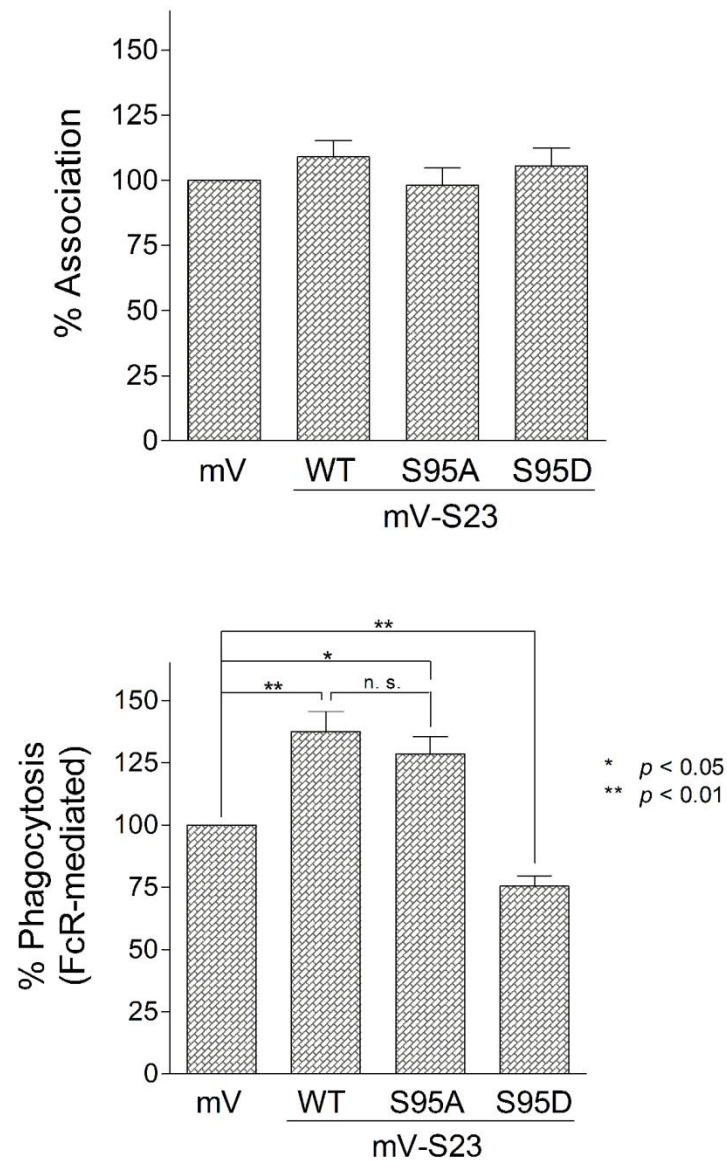


図 3-2-2-2. SNAP-23 変異体の安定発現細胞におけるファゴサイトーシス効率の測定

- (上) 細胞株間で OTRZ と細胞膜との接触効率に差はなかった。
- (下) mV 細胞における OTRZ の取り込み量を 100% として他の値を標準化しファゴサイトーシス効率とした。mV-S23 S95A 細胞では mV-S23 細胞と同程度の亢進が見られたが、mV-S23 S95D 細胞では低下していた。

3.2.3 SNAP-23 のリン酸化がファゴソームの成熟過程へ及ぼす影響についての検証

mV-S23 S95D 細胞ではファゴソームの成熟が抑制された

SNAP-23 のリン酸化は、ファゴソームの形成過程に抑制的に機能した（図 3-2-2-1, 図 3-2-2-2）。次に、ファゴソームの成熟過程へはどのような影響を及ぼすのかを検証するため、RB-dextran を用いてファゴソーム - ライソゾーム融合について調べた。図 3-2-3-1 は細胞にラテックスビーズを与えて 15 分経過後のファゴソームについて、RB-dextran で染色されていた割合を表したグラフである。コントロールである mV 細胞に比べて、mV-S23 細胞と mV-S23 S95A 細胞はファゴソーム - ライソゾーム融合の亢進が見られたが、mV-S23 S95D 細胞はその割合が 15%程度減少していた。つまり、SNAP-23 のリン酸化変異体によりファゴソームの成熟が阻害されていた。以上のことから、SNAP-23 のリン酸化はファゴソームの形成と成熟過程の両方に抑制的に機能する可能性が考えられた。

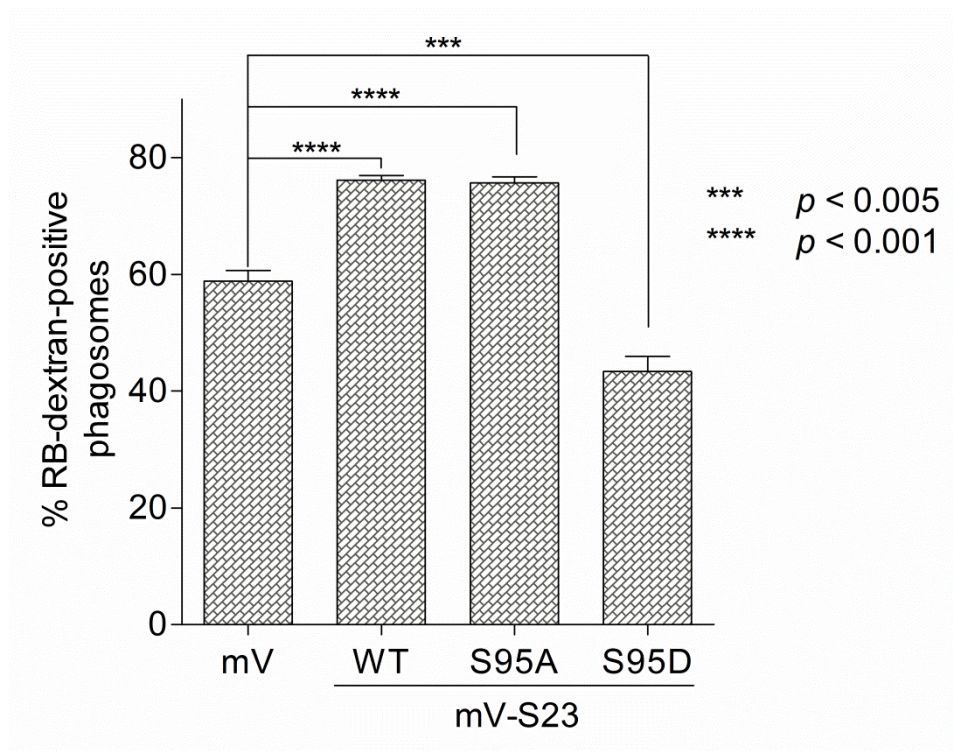


図 3-2-3-1. SNAP-23 変異体の安定発現細胞における RB-dextran を用いたファゴソーム - ライソソーム融合の解析

mVenus 融合 SNAP-23 変異体の安定発現細胞のライソソームを RB-dextran で染色し、ビーズを取り込ませて形成したファゴソームについて、15 分経過後に RB-dextran で染色されているファゴソームの割合を計測した。mV-S23 S95D 細胞はファゴソームの成熟化が阻害されていた。

3.2.4 リン酸化が SNAP-23 と他の SNARE タンパク質との相互作用に及ぼす影響についての解析

mV-S23 S95D では他の SNARE タンパク質との相互作用が低下した

PMA 処理を行った J774 細胞や mV-S23 S95D 細胞においてファゴサイトーシス効率の低下が見られた（図 3-2-2-1, 図 3-2-2-2）。このファゴサイトーシス効率の低下を招く原因の一つとして、SNAP-23 がリン酸化により他の SNARE タンパク質との相互作用の状態を変化させている可能性が考えられたため、免疫沈降実験を行った。先に行った免疫沈降実験（図 3-1-6-1）の場合と同様、本実験においてもそれぞれの安定発現株の細胞抽出液について抗 EGFP 抗体を用いて行った。

その結果、mV-S23 S95A と mV-S23 S95D はいずれも mV-S23 と比較して顕著な差は見られなかった（図 3-2-4-1）。これらの結果から、SNAP-23 Ser95 のリン酸化状態は、他の SNARE タンパク質との相互作用に影響を与えないと考えられた。

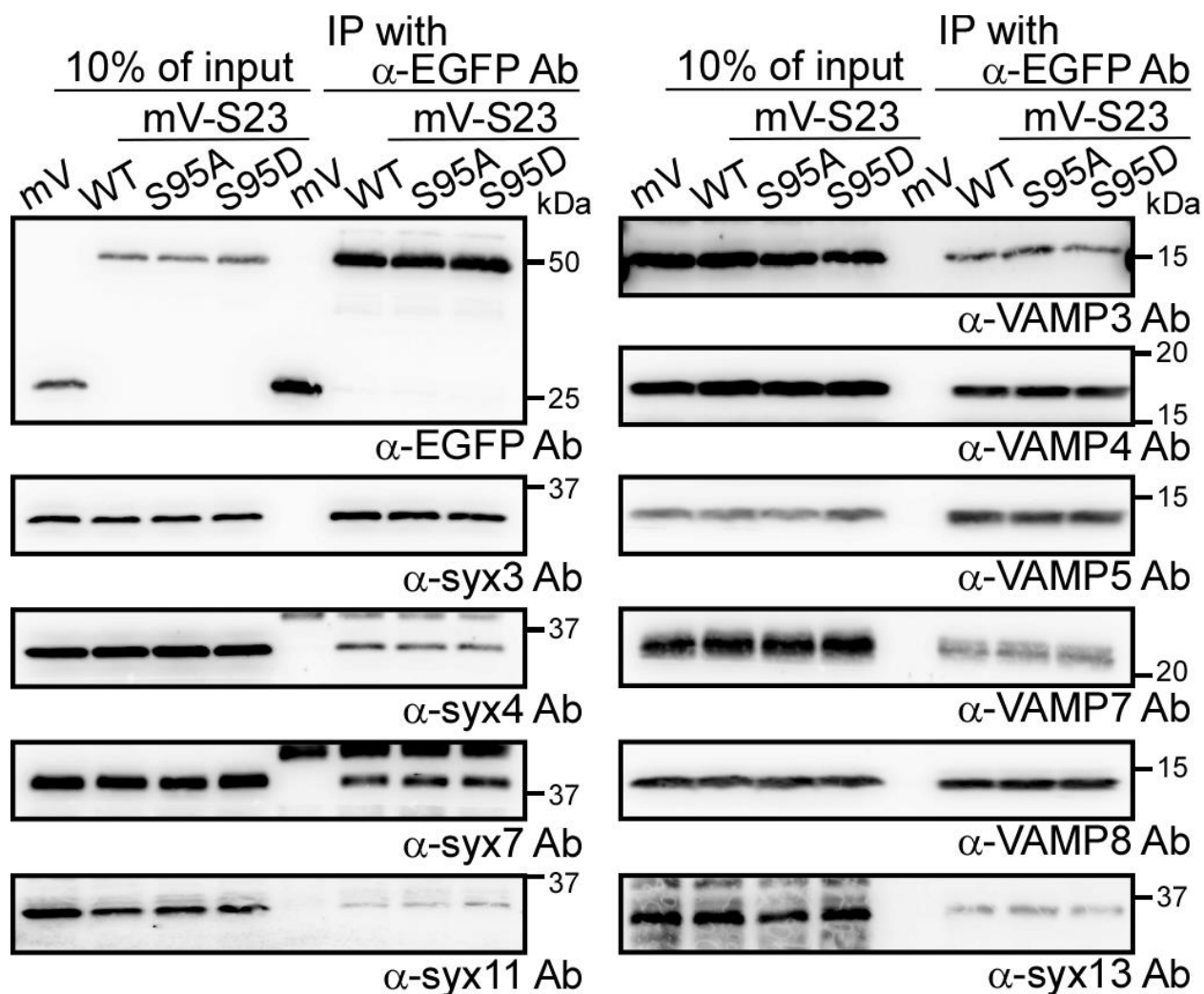


図 3-2-4-1. 免疫沈降実験による mVenus 融合タンパク質と相互作用する SNARE タンパク質の解析

mVenus 融合タンパク質発現細胞の抽出液について、抗 EGFP 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。相互作用するタンパク質は特異的抗体により検出した。その結果、mV-S23 S95A と mV-S23 S95D はいずれも mV-S23 と比較して顕著な差は見られなかった（本文参照）。

3.2.5 mVenus 融合タンパク質の構造変化に関する解析

SNAP-23 S95D 変異体は定常状態で構造が変化していた

mV-S23 S95D 細胞では、ファゴサイトーシスにおけるファゴソームの形成過程と成熟過程のいずれも低下が見られた（図 3-2-2-2, 図 3-2-3-1）。この要因として、SNAP-23 のリン酸化による立体構造の変化が考えられた。そこで、リン酸化による SNAP-23 の構造変化を確認するため FRET 解析を行った。本実験では、先の FRET 解析で用いた野生型 SNAP-23 の FRET プローブ tG-S1-tR-S2 と、それに対して Ser95 をアラニン残基に置換したプローブ tG-S1-tR-S2 S95A、アスパラギン酸残基に置換したプローブ tG-S1-tR-S2 S95D、またネガティブコントロールとして tG-S1-S2-tR を用いた（図 3-2-5-1）。これらにより、SNAP-23 が構造変化を起こした場合に FRET シグナルの上昇が確認できるはずである。

tG-S1-tR-S2 は VAMP5 との共発現により細胞膜上で FRET シグナルの上昇が見られたことから（図 3-1-11-6）、同じ条件で tG-S1-tR-S2 S95A や tG-S1-tR-S2 S95D の場合も FRET シグナルの上昇が見られるか、つまり蛍光基どうしが近接するような構造変化を起こすかを確認した。その結果、tG-S1-tR-S2 S95A は tG-S1-tR-S2 と同様に、VAMP5 と共発現した場合には細胞膜上での FRET シグナルの上昇が観察された。一方、tG-S1-tR-S2 S95D は VAMP5 との共発現の場合だけではなく、Myc-vector との共発現でもシグナル上昇が確認できた（図 3-2-5-2）。このことから、tG-S1-tR-S2 S95D は恒常的に蛍光基が近接していることが示唆された。

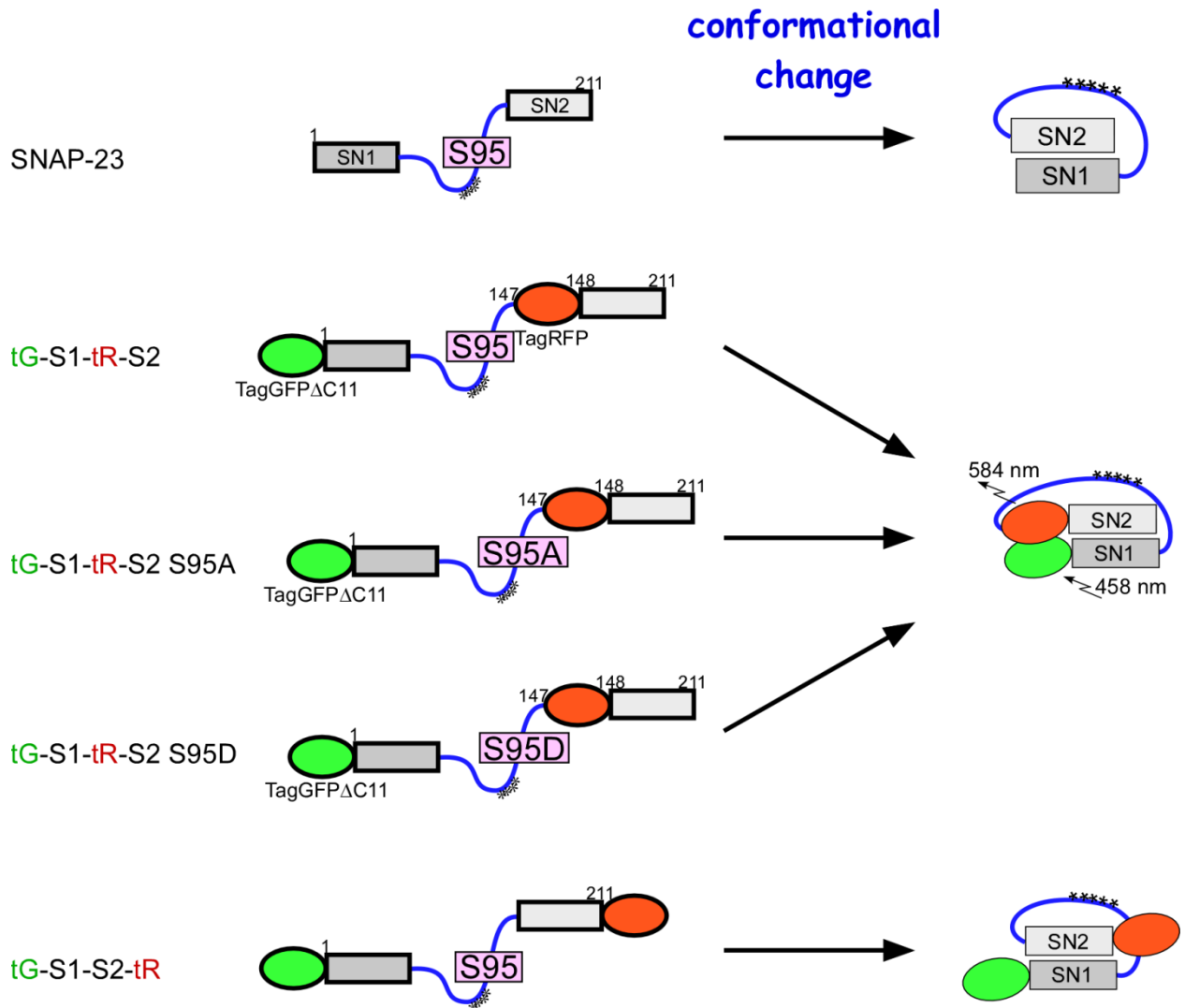


図 3-2-5-1. SNAP-23 変異体の分子内 FRET プローブ模式図

- (左) 野生型 SNAP-23 の分子内 FRET プローブ tG-S1-tR-S2 に対して、95 番目のセリン残基をアラニン残基 (tG-S1-tR-S2 S95A) またはアスパラギン酸残基 (tG-S1-tR-S2 S95D) に置換した FRET プローブを作製した。
- (右) 構造変化により二つの SNARE モチーフが非常に近づく状態になると FRET シグナルの上昇が観察できる。

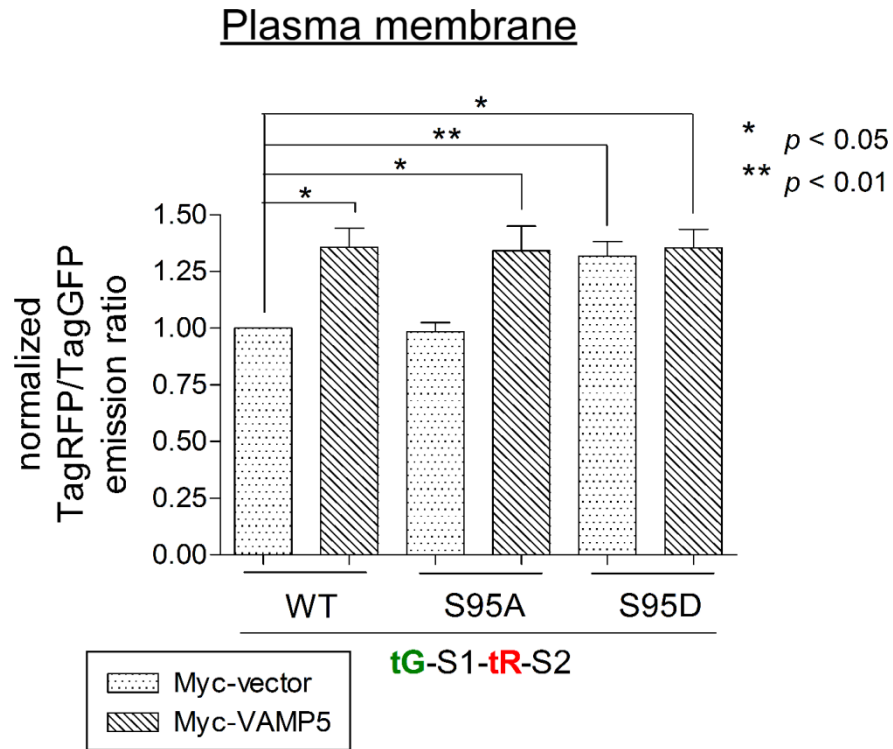


図 3-2-5-2. 細胞膜上での SNAP-23 変異体の FRET 解析

tG-S1-tR-S2, tG-S1-tR-S2 S95A, tG-S1-tR-S2 S95D のそれぞれについて、Myc-vector, Myc-VAMP5 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、tG-S1-tR-S2 + Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2 S95A + Myc-VAMP5 の組合せで共発現させた場合に見られる FRET 効率と同程度の上昇が、tG-S1-tR-S2 S95D の場合、Myc-vector との組合せにおいても見られた。

PMA 処理により SNAP-23 の構造は変化した

J774 細胞を PMA で処理すると Ser95 はリン酸化され（図 3-2-1-1）ファゴサイトーシス効率は減少した（図 3-2-2-1）ことから、PMA 処理によっても SNAP-23 の立体構造が変化すると考えられた。そこで、J774 細胞に tG-S1-tR-S2 を一過的に発現させ、PMA 処理を行った場合の細胞膜上での FRET シグナル計測を行った。その結果、PMA 処理を行うと FRET シグナルの増加が見られた（図 3-2-5-3, 図 3-2-5-4）ことから、PMA 処理による PKC の活性化状態においても SNAP-23 の構造が変化していることが明らかとなり、これは SNAP-23 のリン酸化による可能性が考えられた。ネガティブコントロールである tG-S1-S2-tR を発現させた細胞では、このような上昇は確認できなかった（図 3-2-5-4）。

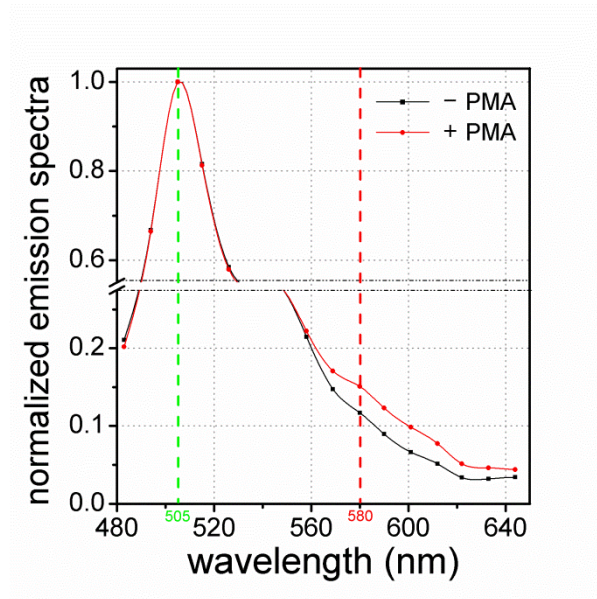


図 3-2-5-3. PMA 処理細胞における蛍光波長スペクトルの計測

J774 細胞に **tG-S1-tR-S2** を一過的に発現させた後に PMA 処理を行い、共焦点顕微鏡を用いて細胞膜上における **tG-S1-tR-S2** の蛍光波長スペクトルを計測し、ドナー分子 (**TagGFPΔC11**) の蛍光波長である 505 nm を基準に標準化した。これにより、FRET が起きていればアクセプター分子 (**TagRFP**) の蛍光波長である 580 nm 付近でスペクトルの増加が見られる。

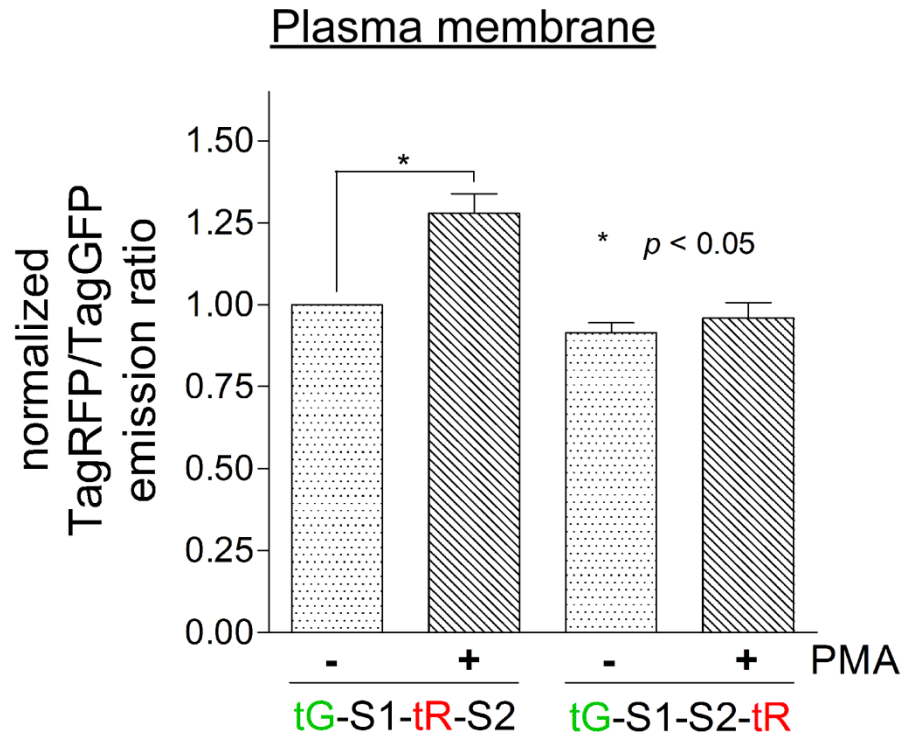


図 3-2-5-4. 細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析 (PMA 処理)

tG-S1-tR-S2 と tG-S1-S2-tR を発現させたそれぞれの細胞について PMA 処理した後、FRET 効率を計測した。PMA 未処理の tG-S1-tR-S2 の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。PMA 処理を行った場合に FRET シグナルの上昇が見られた。

SNAP-23 S95A 変異体は PMA 処理にかかわらず構造変化が起きなかった

次に、作製した SNAP-23 変異体の FRET プローブを用いて PMA 処理を行った場合の FRET 解析を行った。その結果、**tG-S1-tR-S2 S95A** では PMA 処理を行っても FRET シグナルの上昇は確認できなかった一方で、**tG-S1-tR-S2 S95D** では PMA 処理にかかわらずコントロールに比べて強い FRET シグナルが検出された（図 3-2-5-5）。つまり、S95A 変異体では PMA 処理による構造変化が起きず、S95D 変異体は先の結果（図 3-2-5-2）と同様に定常状態で構造変化が起きていることがわかった。以上の結果から、SNAP-23 は Ser95 のリン酸化によって構造が大きく変化することが示唆された。

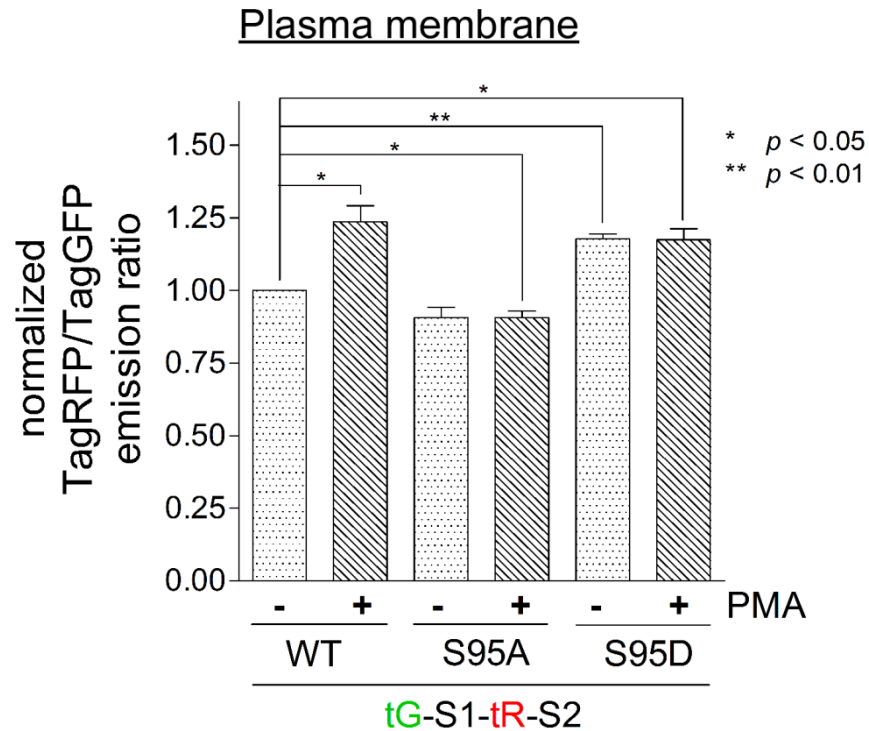


図 3-2-5-5. 細胞膜上での SNAP-23 変異体の FRET 解析 (PMA 処理)

tG-S1-tR-S2, tG-S1-tR-S2 S95A, tG-S1-tR-S2 S95D のそれぞれを発現させた細胞について PMA 処理し、FRET 効率を計測した。PMA 未処理の tG-S1-tR-S2 の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。tG-S1-tR-S2 S95A では PMA 処理を行っても FRET シグナルの上昇は見られず、tG-S1-tR-S2 S95D は PMA 処理にかかわらずシグナルが上昇していた。

3.2.6 SNAP-23 のリン酸化酵素に関する検討

IKK2 との共発現で細胞膜上の SNAP-23 は構造変化しなかった

これまでの研究から、SNAP-23 はファゴサイトーシスにおいて機能し、それには SNAP-23 のリン酸化が関与することが明らかとなった。そこで次に、SNAP-23 のリン酸化酵素の同定を試みた。

SNAP-23 は肥満細胞においてリン酸化されエキソサイトーシスを制御している。このとき、IKK (inhibitor κB kinase) のサブユニットである IKK2 がヒト SNAP-23 の Ser95 と Ser120 をリン酸化することでエキソサイトーシス時の膜融合を制御していることが報告されている^[38]。IKK は TNF- α などの刺激により活性化され、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子 NF- κ B (nuclear factor-κB) と結合している抑制因子 I κ B (inhibitor κB) をリン酸化する酵素である。この IKK2 がエキソサイトーシスの場合と同様にファゴサイトーシスにおいても SNAP-23 のリン酸化酵素である可能性を考え、IKK2 に着目して実験を行った。

IKK2 が SNAP-23 のリン酸化に関与するのであれば、IKK2 と SNAP-23 の FRET プローブとを共発現することで FRET シグナルの上昇、つまり SNAP-23 のリン酸化にともなう構造変化が起きると考えられる。そこで、Myc タグを付加した IKK2 と SNAP-23 の FRET プローブである tG-S1-tR-S2 を一過的に発現した細胞において、細胞膜上の FRET シグナル計測を行った。その結果、コントロールである Myc-vector との共発現の場合と同程度のシグナルだった (図 3-2-6-1)。つまり、細胞膜上では IKK2 との共発現による SNAP-23 の構造変化は確認できなかった。

Plasma membrane

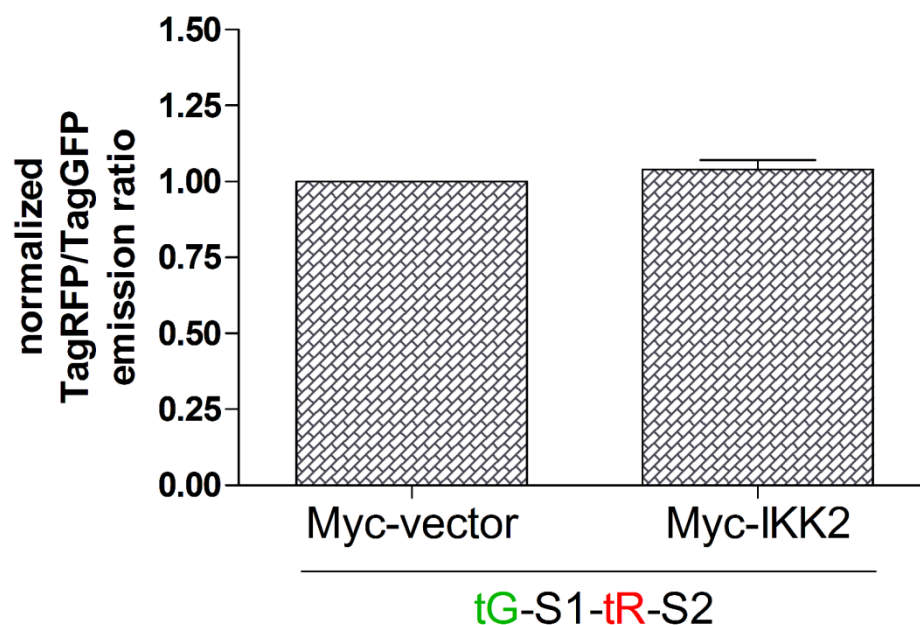


図 3-2-6-1. 細胞膜上での SNAP-23 の FRET 解析

tG-S1-tR-S2 と Myc-vector, Myc-IKK2 を一過的に共発現させスペクトル計測を行い、Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。Myc-IKK2 を共発現させた場合、細胞膜上における FRET 効率の上昇は見られなかった。

IKK2 との共発現によりファゴソーム膜上の SNAP-23 は構造変化した

IKK2 との共発現で細胞膜上の SNAP-23 の構造に変化は見られなかった (図 3-2-6-1) ため、次にファゴソーム膜上について同様に調べた。tG-S1-tR-S2, tG-S1-tR-S2 S95A, tG-S1-tR-S2 S95D それぞれについて Myc-vector, Myc-IKK2 を一過的に発現させた細胞に オプソニン化ザイモサンを与えファゴソームを形成させた。これらのファゴソーム膜上の FRET シグナルを計測したところ、野生型 SNAP-23 において Myc-IKK2 との共発現で 顕著なシグナルの上昇が観察された。一方、SNAP-23 S95A 変異体では、そのような FRET シグナルの上昇は見られなかった (図 3-1-6-2)。つまり、ファゴソーム膜上の SNAP-23 Ser95 は IKK2 によってリン酸化され自身の構造変化を起こしていることが示唆された。また、SNAP-23 S95D 変異体では Myc-IKK2 の発現にかかわらず FRET シグナルの上昇が観察された。

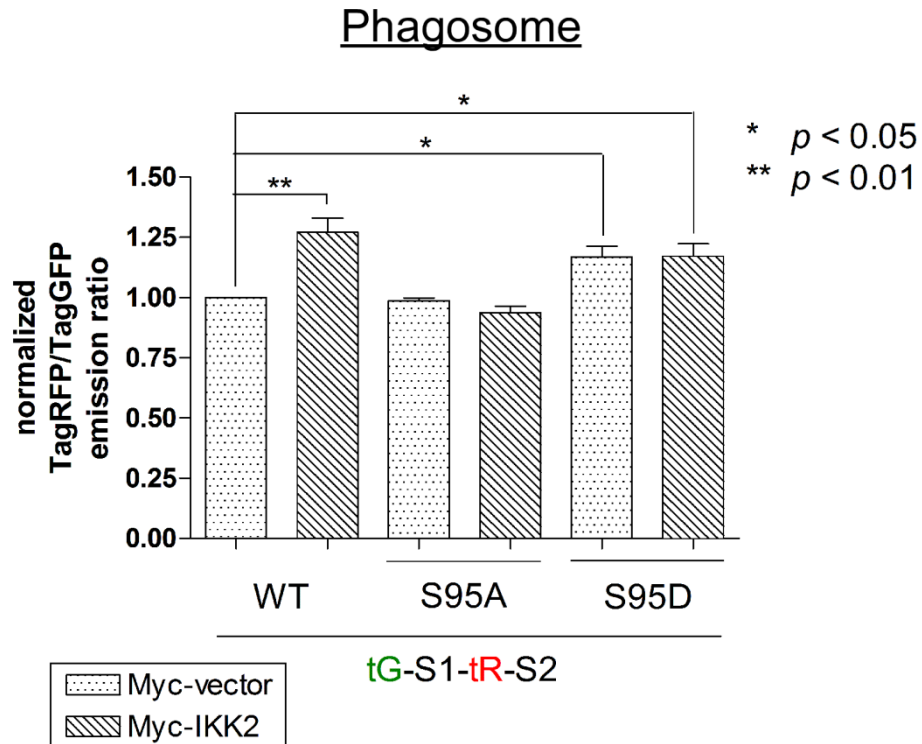


図 3-2-6-2. ファゴソーム膜上での SNAP-23 変異体の FRET 解析

tG-S1-tR-S2, tG-S1-tR-S2 S95A, tG-S1-tR-S2 S95D のそれぞれについて Myc-vector, Myc-IKK2 を一過的に共発現させた細胞にファゴソームを形成させた。これらのファゴソーム膜上におけるスペクトル計測を行い、tG-S1-tR-S2+Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。野生型 SNAP-23 の FRET プローブと Myc-IKK2 とを共発現させた場合、ファゴソーム膜上における FRET 効率は増加していた。

IKK2 の阻害剤によりファゴソーム膜上の FRET シグナルは低下した

ファゴソーム膜上では、IKK2 と野生型 SNAP-23 の FRET プローブとの共発現により、顕著な FRET シグナル増加が確認された(図 3-2-6-2)。SNAP-23 のリン酸化における IKK2 の作用についてより詳細に検討するため、IKK2 の阻害剤である SC-514 を使用して解析を行った。tG-S1-tR-S2+Myc-IKK2 の組合せでファゴソーム膜上において FRET 効率の上昇が見られたため(図 3-2-6-2)、この条件における SC-514 を加えた場合の FRET 効率への影響について検証した。その結果、SC-514 (最終濃度 10 μ M) を加えた場合の FRET シグナルが、コントロールである tG-S1-tR-S2+Myc-vector に見られるシグナルと同程度にまで減少した(図 3-2-6-3)。このことは、図 3-2-6-2 で観察された FRET 効率の増加は、IKK2 特異的なリン酸化によるものであることを強く支持する結果である。以上より、ファゴソーム膜上における SNAP-23 のリン酸化酵素として IKK2 が考えられたが、厳密に決定するには IKK2 の発現抑制による影響についての解析などを行う必要があり、今後の課題である。

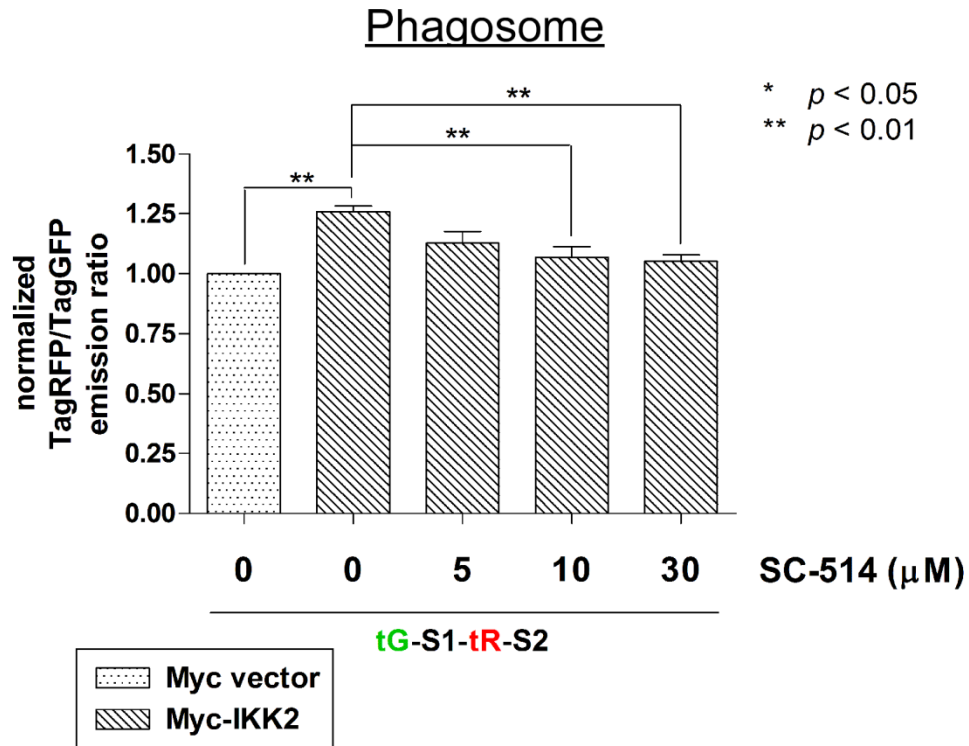


図 3-2-6-3. IKK2 阻害剤を加えたファゴソーム膜上での SNAP-23 の FRET 解析

tG-S1-tR-S2, Myc-IKK2 を一過的に共発現させた細胞に IKK2 の阻害剤 (SC-514) を加え、ファゴソーム膜上のスペクトル計測を行い、tG-S1-tR-S2+Myc-vector の場合を基準にして他を標準化し FRET 効率とした。阻害剤を加えることでファゴソーム膜上の FRET シグナルの増加は抑制された。

4. 実験考察

本研究は、ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の機能およびその制御機構の解明を目的として行った。

【1】ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の機能解明を目的とした実験の結果、① SNAP-23 を過剰発現するとファゴサイトーシス反応での取り込みおよびファゴソームの成熟が亢進した一方、②SNAP-23 の発現を抑制するとファゴサイトーシスにおける取り込みとファゴソーム成熟の両過程が抑制された。また、③FRET 解析により SNAP-23 が細胞膜上とファゴソーム膜上で構造変化を起こすことがわかった。このことから、SNAP-23 がファゴサイトーシスにおける膜融合について促進的に機能していることが明らかとなった。また、【2】SNAP-23 のファゴサイトーシスにおける制御機構を明らかにすることを目的として行った実験から、④SNAP-23 の 95 番目のセリン残基のリン酸化によりファゴソームの形成および成熟の両過程が阻害されること、⑤FRET 解析により、その阻害はリン酸化にともなう SNAP-23 の構造変化によるものであること、⑥ファゴソーム膜上の SNAP-23 のリン酸化酵素は IKK2 であることが考えられた。以上から、ファゴサイトーシスにおける SNAP-23 の機能制御の一つが、リン酸化によるものであることが明らかになった。

NOX2 複合体形成における SNAP-23 の機能

食細胞における SNAP-23 の機能について、現在までにわかっていることがいくつかある。好中球では、細胞外の刺激による細胞膜での ROS の放出において、SNAP-23 が細胞膜局在の syntaxin4 および特殊顆粒膜局在の VAMP1, VAMP2 と機能的 SNARE 複合体

を形成することが明らかになっている^[29,30]。この特殊顆粒には NOX2 複合体の形成因子が局在し、エキソサイトーシスによって細胞膜上へ運ばれ活性化し ROS が放出される。この場合、SNAP-23 は細胞膜ではなく特殊顆粒上に存在しエキソサイトーシスに機能することが報告されている。一方、ファゴソーム膜上の NOX2 複合体の形成（輸送）に SNAP-23 が機能するのかは不明である。マクロファージの場合、好中球に見られる特殊顆粒が存在しないので異なる機構の存在が予想されるが、細胞膜上やファゴソーム膜上での NOX2 複合体形成に機能する SNARE タンパク質はわかっていない。

今回の結果から、マクロファージにおいて SNAP-23 の過剰発現により細胞膜やファゴソーム膜上での ROS 産生が亢進することがわかった（図 3-1-2-3, 図 3-1-3-2）。ファゴソーム膜上の解析系は、ROS 産生の過程だけではなくルミノールビーズの取り込み過程も同時に見ていることになるが、SNAP-23 の過剰発現によるファゴサイトーシスの亢進は約 2.4 倍であったのに対し（図 3-1-4-2）、ファゴソーム内部の ROS 産生量は約 4 倍に亢進されていた（図 3-1-3-2）。したがって、SNAP-23 の過剰発現によりファゴソーム内部の ROS 産生が亢進される可能性は十分に考えられる。

SNARE タンパク質（SNAP-23）の過剰発現が ROS 産生を亢進するということは、細胞膜やファゴソーム膜上での NOX2 複合体の形成に小胞輸送が関与することを示唆する。つまり、NOX2 複合体の細胞質因子は、細胞質から直接的に膜上へ局在化するというよりは、むしろ一時的に何らかの小胞に局在しその小胞を介した膜融合によって膜上へ局在化するモデルが考えられた（図 4-1）。実際、マクロファージではファゴサイトーシス時に細胞質因子 $p40^{phox}$ が一過的に初期エンドソームに局在するというこのモデルを支持する報告もある^[39]。しかし、予備的実験で mCherry（赤色蛍光タンパク質）付加 $p40^{phox}$ （mCherry- $p40^{phox}$ ）を作製し、J774 細胞に発現させファゴサイトーシス時の様子を観察したが、 $p40^{phox}$ の局在する小胞は見られなかった（未発表）。これは、小胞への局在化は一過的で非常に早い反応のために検出できなかった可能性があり、今後ライブイメージング等により解析する必要がある。また、樹状細胞では、ライソゾーム由来と予想され

る小胞に NOX2 複合体因子が存在し、小胞輸送 (Rab27a の関与が証明されている^[2]) によってファゴソームへ運ばれることが明らかになっている。マクロファージでは、NOX2 複合体因子の局在する小胞やそこに局在する SNARE タンパク質 (SNAP-23 のパートナー候補) については、全く明らかにされていないので、今後の課題として検証する必要がある。

また SNAP-23 Δ C8 の過剰発現に関して、PMA 処理した場合の細胞膜上での ROS 放出はコントロールに比べて著しい阻害が見られたのに対し、ファゴソーム内部の ROS 産生はコントロールと同程度であった。これはおそらく、ファゴソーム膜上の SNAP-23 Δ C8 は、NOX2 複合体因子の局在化に関与する他の SNARE タンパク質と相互作用できないためだと考えられた。このとき内在性 SNAP-23 は他の SNARE タンパク質との相互作用および機能的複合体の形成が可能のため、mV-S23 Δ C8 細胞でもファゴソーム膜上の ROS 産生はコントロールと同程度であった可能性がある。

一方、細胞膜上で著しい阻害効果を発揮する SNAP-23 Δ C8 については、NOX2 複合体因子の細胞膜局在に関与する SNARE タンパク質との相互作用は可能だが機能的複合体の形成はできない可能性が考えられる。この場合、SNAP-23 Δ C8 がパートナー分子を奪ってしまうため内在性 SNAP-23 は NOX2 複合体の形成に機能できなくなり、結果として ROS 放出の阻害が見られたと考えられる。これら細胞膜上とファゴソーム膜上における差は、両方で NOX2 複合体の形成因子の局在化に関与する SNAP-23 のパートナー分子が異なることを示唆している。

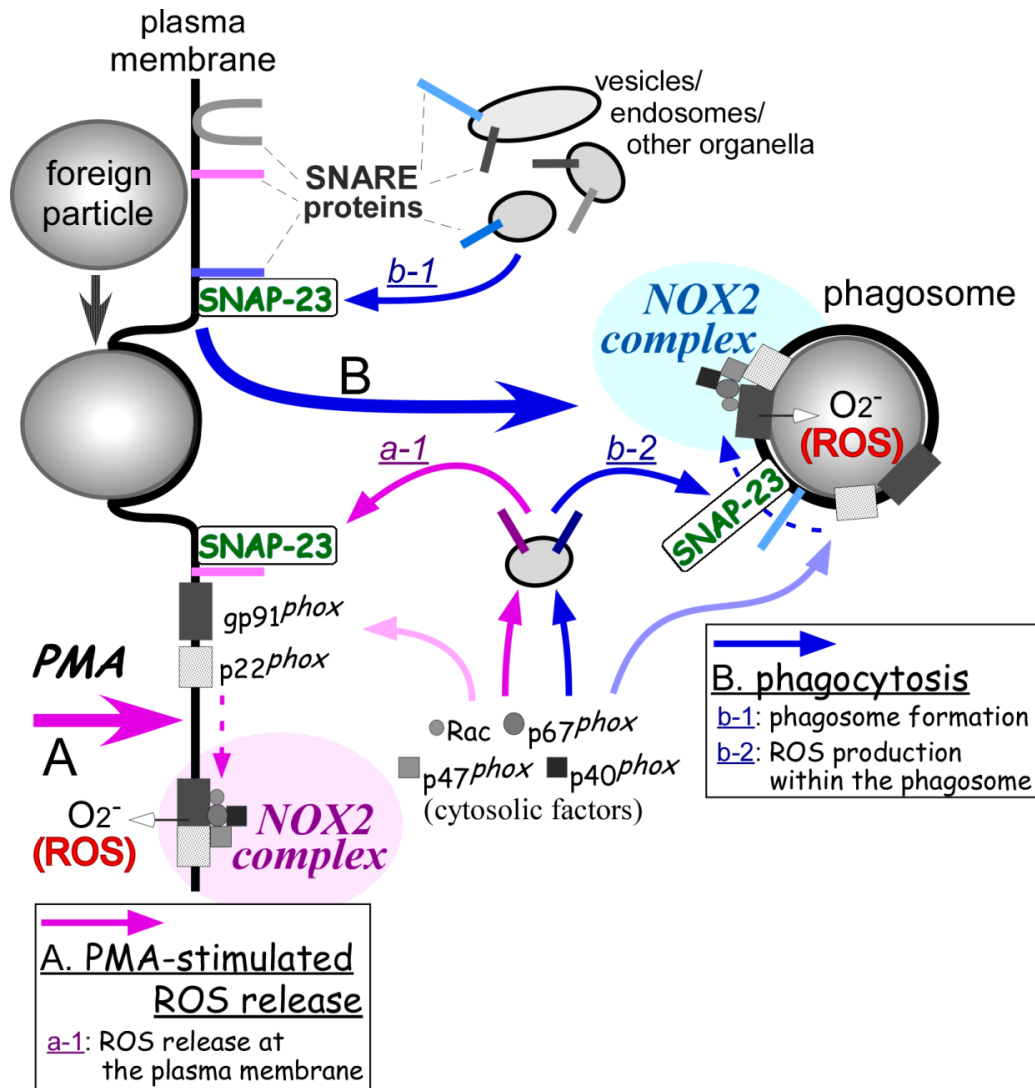


図 4-1. SNAP-23 が関与する NOX2 複合体形成のモデル

SNAP-23 は、細胞膜上での ROS の放出 (A) およびファゴソームの形成と内部での ROS 産生 (B) に関与している。NOX2 複合体は PMA 処理によって細胞膜上に形成されるが (A)、このとき細胞質局在の NOX2 複合体形成因子 (Rac, p67^{phox}, p47^{phox}) は一度小胞に局在してから小胞輸送によって細胞膜上にリクルートされると考えられる (a-1)。また、NOX2 複合体はファゴソーム成熟の過程でファゴソーム膜上にも形成される (B)。このときも、細胞質局在の NOX2 複合体形成因子 (Rac, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}) は一度小胞に局在してから小胞輸送によってファゴソーム膜上にリクルートされると考えられる (b-2)。いずれの場合も、細胞質因子が直接膜に局在化する可能性もある。小胞輸送においては小胞とターゲット膜とが融合する必要があるが、SNAP-23ΔC8 の場合の結果から a-1 と b-2 とで機能する SNAP-23 のパートナー分子が異なる可能性が考えられる。

SNAP-23 との機能的複合体形成分子

SNARE タンパク質による膜融合では、融合する二つの膜上に存在する一つの R-SNARE と三つの Q-SNARE が適当な組合せで複合体を形成する必要がある。SNAP-23 は Q-SNARE モチーフを二つ有しているので、SNARE 複合体を形成するには他に R-SNARE が一つと Q-SNARE が一つ必要である。

今回の免疫沈降実験の結果（図 3-1-6-1）から、R-SNARE の候補としては VAMP3 と VAMP7 が考えられた。mV-S23ΔC8 と VAMP3 や VAMP7 との結合量が減少していたことから、VAMP3 や VAMP7 との結合に SNAP-23 の C 末端が重要であると思われる。mV-S23ΔC8 細胞で見られた ROS の産生量の減少（図 3-1-2-3, 図 3-1-3-2）は、これら SNARE タンパク質との相互作用の低下による可能性が考えられた。特に VAMP7 に関してはファゴソーム膜上において SNAP-23 との共発現により FRET シグナルの増加が見られた（図 3-1-11-9）ことから、ファゴソーム成熟過程での SNAP-23 のパートナー分子であると考えられた。しかし、現時点において SNAP-23 と VAMP3 もしくは VAMP7 が機能的な SNARE 複合体を形成する確証は得られておらず、今後 VAMP3 や VAMP7 自身の機能解析も必要である。これらの安定発現株を樹立して今回同様の実験を行うことによる裏付けや、発現抑制した場合の検証もしなければならない。

一方、VAMP5 は免疫沈降実験においては mV-S23 と mV-S23ΔC8 とで差が見られなかったが（図 3-1-6-1）、細胞膜上において SNAP-23 との共発現による FRET シグナルの増加が見られた（図 3-1-11-6）ことから、SNAP-23 の C 末端以外の領域で結合しファゴソームの形成過程においては SNAP-23 と機能的複合体を形成している可能性がある。VAMP8 についても免疫沈降の結果に差がほとんどなかった（図 3-1-6-1）ことから SNAP-23 の C 末端以外の領域で結合している可能性が考えられるが、現在のところファゴサイトーシスへの VAMP8 の関与は不明である（単離したファゴソームでの Western blot 解析により、VAMP8 がファゴソーム膜上に局在することは確認した（データ掲載せず））。

SNAP-23 と複合体を形成する Q-SNARE としては、syntaxin ファミリーで細胞膜局在である syntaxin3, syntaxin4, syntaxin11 とエンドソーム・ライソゾーム局在である syntaxin7, syntaxin13 が考えられた。先述のように好中球では活性酸素の放出に syntaxin4 と SNAP-23 が共同して機能することが知られており^[29, 30]、また syntaxin3 もある種の細胞では SNAP-23 と細胞膜上で相互作用する^[40, 41, 42]ことから、ファゴサイトーシスにおいても機能的に SNAP-23 と相互作用する可能性がある。FRET 解析の結果より、syntaxin3 は細胞膜上において SNAP-23 と VAMP5 による FRET シグナルをさらに増強する（図 3-1-11-7）ことから、ファゴソーム形成における SNAP-23 のパートナー分子である可能性が考えられた。しかし、この組合せで機能すると仮定した場合には、SNAP-23 と VAMP5, syntaxin3 はいずれも細胞膜局在であるため、細胞膜上では常に SNARE 複合体が形成されていることになる。この点については、定常状態で SNARE 複合体を形成することで SNAP-23 の機能を抑制し不必要な取り込みを阻害している可能性が考えられるが、今後さらに詳細な解析が必要であると思われる。

syntaxin2 も細胞膜局在の SNARE タンパク質であるが、今回の免疫沈降実験の結果では SNAP-23 との結合がほとんど見られなかった（図 3-1-6-1）ことから syntaxin2 と複合体を形成する可能性は低いと考えられた。エンドソーム・ライソゾーム局在の syntaxin7 と syntaxin13 は、ファゴソーム上にリクルートされ成熟過程に関与することが報告されている^[25]ことから、SNAP-23 と相互作用する可能性があり、単離ファゴソームを用いた免疫沈降実験等の解析が今後必要と考えられる。

また、SNAP-23 の機能を調節する SNARE タンパク質として syntaxin11 が考えられた。マクロファージをインターフェロン γ で活性化すると抗原提示能力が亢進するが、このときファゴソーム膜上への syntaxin11 の局在化が増加することが報告されている^[3]。定常状態のマクロファージでは、ファゴソーム内で抗原分子が過剰に分解されるために抗原提示効率が低いことが知られている。インターフェロン γ 処理によって抗原提示能力が亢進するとは、つまりファゴソームの成熟（分解）が抑制されているということである。

実際、樹状細胞ではファゴソーム内部は酸性化せずに中性に保たれており、高い抗原提示能力を持つことが知られている^[2]。もともと syntaxin11 が SNAP-23 結合タンパク質として同定されたという経緯^[43]や活性化マクロファージではファゴソーム膜上の局在量が増加している^[3]ことなどからファゴソーム成熟における SNAP-23 の機能を syntaxin11 が調節している可能性が考えられたが、本研究において syntaxin11 の解析は行っていない。

SNAP-23 のリン酸化の意義

SNAP-23 は、Ser95 のリン酸化によってファゴサイトーシスにおける機能が抑制されることが明らかとなった。また、FRET 解析から定常状態で構造変化を起こしていること（図 3-2-5-2, 図 3-2-5-5, 図 3-2-6-2）もわかった。これらの結果から、SNAP-23 は Ser95 のリン酸化によってその構造がコンパクトな状態へと変化し、そのためにファゴソームの形成や成熟が阻害されるといったモデルが考えられた。

生体にとっては、異物が体内に侵入した際に素早く殺菌・分解することは生命の維持に重要なことだと思われるが、そこで機能する SNAP-23 がリン酸化によって抑制されるとすると、生体内で SNAP-23 をリン酸化する意義にはどういったことが考えられるのか。例えば、細胞内に多くの異物を取り込んだことによって処理が追いつかない状況では、それ以上の取り込みを停止するため SNAP-23 がリン酸化され、ファゴサイトーシス効率が抑制されるといった可能性が考えられる。SNAP-23 はファゴソームの成熟過程にも機能することから、過剰な取り込みを阻害することで既に取り込んだ異物の殺菌・分解に SNAP-23 を優先的に利用しているのかもしれない。

またファゴソーム成熟の抑制に関しては、抗原提示との関係が考えられる。食細胞のうちマクロファージと樹状細胞は抗原提示能を有するが、好中球は抗原提示能を持たない。さらに樹状細胞の方がその能力は高く、その差はファゴソーム内部の pH の違いに

因るといった報告がある^[2]。pH を低下させると抗原提示能は下がることから、抗原提示能を有するマクロファージにおいてはファゴソーム内部の pH を一定以上に保つことが重要である。そのためには、酸性化に関与する V-ATPase のファゴソームへのリクルート、つまりファゴソームとライソゾームとの融合を、ファゴソーム内部が適当な pH となるように抑制する必要がある。そういった膜融合の抑制と促進の微調整に SNAP-23 のリン酸化が利用されているのかもしれない。また、細胞分裂期やその前後の時期にファゴサイトーシスを停止させるためといったことも考えられるが、いずれも現時点では不明であり今後の検討課題である。

現時点での問題点および今後考えられる実験

siRNA による SNAP-23 の発現抑制実験では、ファゴサイトーシスや NOX2 複合体の形成に関与する調べた限りの分子の発現に影響がないことを確認した。調べていないタンパク質に siRNA 操作による直接的あるいは二次的な影響が出ている可能性も考えられたが、今回は二種類の異なる配列の siRNA を用いて検討を行い、それぞれについて同様の結果を得ている。また、SNAP-23 の発現抑制細胞で見られたファゴソーム成熟過程の遅延は SNAP-23 を過剰発現することで回復した（図 3-1-10-8, 図 3-1-10-9）ことから、siRNA 操作による SNAP-23 以外のタンパク質への直接的あるいは二次的な影響が出ている可能性はほとんど排除できると考えられる。

本研究では SNAP-23 のリン酸化酵素として IKK2 に着目した検討を行ったが、過剰発現と阻害剤を加えた場合の検討しか行えなかった。そこで今後は、IKK2 の siRNA を用いた発現抑制実験や不活性型 (kinase dead) 変異体を用いた解析が必要と考えられる。本研究ではっきりしなかった細胞膜でのリン酸化酵素を同定することも重要である。また、今回の検討では FRET 解析しか行っていないため、今後はより具体的にファゴソームの形成過程や成熟過程に着目した検証を行うことを計画している。

本研究で用いた J774 細胞は IL-1 を産生するマウスサルコーマ由来のマクロファージ様細胞株であり、高い貪食能を持つことから、モデル細胞としてファゴサイトーシスの研究に広く用いられている。今後、初代培養マクロファージにおいても遺伝子発現操作が可能となった場合には、マウス腹腔より単離されたマクロファージ等を用いることによって、今回の知見の普遍性の確認を行うことが期待される。

5. 実験方法

細胞培養法

すべての細胞は、37°C, 5% CO₂ で培養した。培地は、J774 細胞は 10% FBS (JRH バイオサイエンス社) 添加 RPMI-1640 (和光純薬工業社) を、HEK293T 細胞および Phoenix-AMPHO 細胞は 10% FBS 添加 DMEM (シグマ・アルドリッチ社) を使用した。また、抗生剤として 1% penicillin, streptomycin, neomycin 混合溶液 (GIBCO 社) を加えた。レトロウイルスを用いて作製した安定発現株 (J774 細胞) については、組み込まれた cDNA 発現の保持と安定化のために最終濃度 2 µg/ml の puromycin を添加した。

プラスミド構築法

J774 細胞から RNA 分離試薬 (RNAwiz: ライフテクノロジーズ社) を用いて total RNA を得た。この total RNA を鋳型に目的タンパク質の cDNA 特異的なプライマーを用いて、PCR 法により一本鎖 cDNA を作製した。次に、その一本鎖 cDNA を鋳型に 5'側と 3'側に対応し適当な制限酵素部位を導入したプライマーを用いて PCR 法により目的タンパク質の cDNA を増幅した。これらを pmVenus ベクター, pFLAG ベクター, pcDNA3-Myc ベクターに組み込んだ。また、レトロウイルス作製用 pCX4puro ベクターには mVenus 融合タンパク質の全長を組み込んだ。目的タンパク質の cDNA 断片は両末端を適当な制限酵素で切断し、導入するベクターにリガーゼでライゲーション (rapid DNA ligation kit: ロシュ・ダイアグノスティックス社) した後、大腸菌 (XL10-Gold) にトランスフォーメーションした。トランスフォーメーションした大腸菌は LB プレートに撒き 37°C で培養、翌日にコロニーを LB 培地で培養し、その大腸菌から目的プラスミドを抽出し

た。LB にはそのベクターが耐性を持つ抗生剤を最終濃度 0.1%で加えた。大腸菌からのプラスミド抽出は Wizard 試薬（プロメガ社）を用いて行った。

安定発現株の構築法

レトロウイルス作製用に Phoenix-AMPHO 細胞と、そのウイルスを用いた安定発現株の作製用に J774 細胞を直径 6 cm の dish で培養し使用した。

はじめに、J774 細胞に感染させるためのレトロウイルスを Phoenix-AMPHO 細胞にて作製した。レトロウイルス作製用プラスミドは、安定発現させる目的タンパク質の cDNA を puromycin 耐性ベクター（pCX4puro）に組み込んだものを使用した。この puromycin 耐性プラスミド 2 μ g に 60 μ l DMEM と 2 μ l の 1 μ g/ml PEI（polyethylenimine）を加えて混和し、20 分間静置する。この間に Phoenix-AMPHO 細胞を PBS で 3 回洗浄して 2.5 ml の DMEM を加えた。20 分経過後にプラスミド溶液を細胞に加え、37°C で 3 時間培養した。3 時間の培養後、2.5 ml の 20% FBS 添加 DMEM を加えて 32°C で 3 日間培養した。

3 日後、J774 細胞を Phoenix-AMPHO 細胞の培養上清（ウイルス粒子を含む）で培養することによりウイルス感染させた。J774 細胞は感染 30 分前に 3 ml の培地交換を行い、感染効率を上げるために 15 μ l のポリブレン（最終濃度 10 μ g/ml）を加えて培養した。30 分後に培地を除去し、3 日間培養した Phoenix-AMPHO 細胞の培養上清（0.22 μ m フィルター濾過）を J774 細胞に加えた。32°C で 3 時間培養後、最終濃度が 10%になるように FBS を加えた。適宜培地（RPMI-1640）を加えながら 3 日間培養した後、puromycin（最終濃度 2 μ g/ml）添加培地に交換した。感染し目的タンパク質を発現する細胞はこの培地で選択される。このようにしてクローニングした puromycin 耐性細胞を培養して実験に用いた。

J774 細胞への一過的な遺伝子導入法

J774 細胞は遺伝子導入の前日に直径 35 mm のガラス底 dish に準備した。トランスフェクションするプラスミド 1.5 μ g に対して 100 μ l の RPMI-1640 と 2 μ l の X-tremeGENE HP (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を加えて混和し、20 分間静置した。その間に細胞は 2 ml 培地 (RPMI-1640) に交換し、20 分静置したプラスミド溶液を加えて 37°C で 30 分間培養した。30 分後に 2 ml の培地を加え 37°C で培養し、翌日に解析に用いた。

HEK293T 細胞への一過的な遺伝子導入法

HEK293T 細胞は遺伝子導入の前日に直径 35 mm の dish に準備した。免疫沈降実験に用いる FLAG との融合 SNARE タンパク質と、相互作用を調べる mVenus との融合 SNARE タンパク質のそれぞれの発現プラスミドを 0.8 μ g ずつ用いて (計 1.6 μ g) トランスフェクションし共発現させた。具体的には、プラスミドに 100 μ l DMEM と 1.5 μ l の 1 mg/ml PEI を加え混和し、20 分間静置した。その間に細胞は 2 ml 培地 (DMEM) に交換し、20 分静置したプラスミド溶液を加えて 37°C で培養した。翌日、トランスフェクションした細胞から細胞抽出液を調製し、免疫沈降実験に用いた。

低分子干渉 RNA (siRNA) 導入法

直径 35mm の dish に 1 枚あたり 1.5×10^6 の細胞数になるように細胞を撒き、37°C で 2~3 時間培養後、SNAP-23 の特異的 siRNA#1 (5'-CAUUAACGUAUAACUAAUGA-3' : RNAi 社) もしくは#2 (5'-CGGGACAGAGUAUCCGUAUUU-3' : RNAi 社) をトランスフェクションした。トランスフェクションの操作は、はじめにマイクロチューブに 500 μ l の RPMI-1640 培地を取り、そこに siRNA (最終濃度 20 nM) と 8 μ l の HiPerFect (キアゲン

社)を加え 10 分間静置した。その間に細胞は 500 μ l の新しい培地と交換した。次に、先の siRNA 添加培地を細胞に加え混和した。37°C で 2 時間培養後、2 ml の培地を加えさらに培養し、トランスフェクションから 72 時間後にそれぞれの実験に用いた。

抗体の作製（ウサギを用いたポリクローナル抗体作製）法

本実験では SNAP-23 を認識する抗体の作製にあたり、はじめに抗原として GST 融合 SNAP-23 (GST-SNAP-23) の精製を行った。目的プラスミドを組み込んだ大腸菌 (Rosetta/DE3) を IPTG で発現誘導し大量調製した (約 1 l LB 培地)。これらを集菌した後、GST buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1% TritonX-100, 0.5% プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク社)) を加えて超音波破碎し融合タンパク質を可溶化した。遠心 (10,000 rpm で 20 分間) によって得た上清を 0.8 μ m のフィルターで濾過した後、GST 融合タンパク質精製用アフィニティー担体 (Glutathione Sepharose 4B : GE ヘルスケア社) を加えて 2 時間 4°C で転倒攪拌することで GST 融合タンパク質を結合させた。その後、2,000 rpm で 5 分間遠心して沈殿させた Glutathione Sepharose 4B に wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 0.05% TritonX-100, 0.5% プロテアーゼ阻害剤カクテル) を加えて再度遠心することで洗浄した。これをカラムに積み、さらに 100 ml の wash buffer で洗浄し、GST-SNAP-23 を elution buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 20 mM Glutathione) で溶出した。溶出した GST-SNAP-23 は過剰の glutathione を除去するために限外濾過 (Vivaspin : ザルトリウス社) により 1 mM DTT 添加 PBS に置換し、-80°C で保存した。

初回免疫には、抗原タンパク質 1,200 μ g と 1.5 ml 完全フロイントアジュバントとを超音波処理により乳化させたものをウサギ (日本白色種) 2 羽へ皮下注射した。3 週間後、抗原タンパク質 600 μ g と 1.5 ml 不完全フロイントアジュバントとを乳化させたものを同じ 2 羽のウサギへ皮下注射し、以後 1 週間おきに計 5 回注射した。最後の免疫から 1 週

間後に採血し、翌日に血清を得た。

得た血清から抗 SNAP-23 抗体をアフィニティー精製するために、抗原に用いた GST-SNAP-23 をリガンド固定化用カップリング担体 (CNBr-activated Sepharose 4B : GE ヘルスケア社) に結合させ抗原カラムを作製した。このカラムに血清を通し、100 ml の wash buffer#1 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl) と 100 ml の wash buffer#2 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) とで順次カラムを洗浄し、結合した抗 SNAP-23 抗体を ImmunoPure Gentle Ag/Ab binding buffer (サーモフィッシュヤー・サイエンティフィック社) でマイクロチューブに 500 μ l ずつ 12 本溶出した。これを吸光度 (A280) 測定し、ピークを含む数本の溶出液を Vivaspin 限外濾過膜により濃縮した。濃縮後、stock buffer (50% ethylene-glycol, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.02% NaN₃) で置換しタンパク質濃度を測定した後、-20°C で保存し実験に用いた。

また、ザイモサンを認識する抗体作製のため、ザイモサン (zymosan A : 和光純薬工業社) と完全フロイトアジュバントもしくは不完全フロイトアジュバントとを乳化させたものを、抗 SNAP-23 抗体作製の場合と同様に皮下注射し血清を得た。この血清は、Protein A Sepharose カラム (GE ヘルスケア社) を用いてトータル IgG を精製した後、抗ザイモサン抗体として使用した。

ザイモサン/ラテックスビーズのオプソニン化法

ザイモサン (zymosan A : シグマ・アルドリッチ社) 100 μ g あたり 10 μ g の抗ザイモサン抗体を混和して 37°C で 1 時間反応させた後に 7,000 rpm で 3 分間遠心して上清を除去し HBSS を加えてさらに遠心、上清除去した。これを 3 回繰り返すことでザイモサンを洗浄し、その後ウサギに対するヒツジの IgG (最終濃度 0.1 mg/ml) を加えて 37°C で 1 時間反応させてオプソニン化した。そして先と同様に HBSS で洗浄した後に HBSS で懸濁して実験に用いた。

また、ラテックスビーズ（直径 3.0 μm ：シグマ・アルドリッチ社）はヒトの IgG と混和（最終濃度 0.1 mg/ml）し 37°C で 1 時間反応後に 7,000 rpm で 3 分間遠心して上清を除去、HBSS を加えてさらに遠心し上清を除去した。この操作を 3 回繰り返してビーズを洗浄し、ヒトに対するウサギの IgG（最終濃度 0.1 mg/ml）を加えて 37°C で 1 時間反応させオプソニン化した。その後 HBSS で 3 回洗浄し、HBSS で懸濁して実験に用いた。

免疫染色法

細胞は、観察前日に直径 35 mm のガラス底 dish もしくは直径 12 mm の丸カバーガラスに撒いたものを使用した。細胞は PBS で 3 回洗浄し、固定するためにメタノール(-20°C)を加え-20°C で 7 分間静置した。これを PBS で 3 回洗浄し、2% BSA（PBS で希釈）を加えて 30 分間室温で静置した。その後、各タンパク質に対する抗体（一次抗体）を適宜希釈した抗体溶液を加えて室温で 45 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄後に蛍光標識した抗体（二次抗体）を適宜希釈した抗体溶液を加えて、引き続き 45 分間室温で反応させた。45 分後に抗体溶液を PBS で 3 回洗い流し、共焦点顕微鏡（LSM510meta：カール・ツァイス社）もしくは超解像顕微鏡（Nikon structured illumination system：ニコン社）で観察した。なお、抗体の希釈には 2% BSA を用いた。

細胞イメージング法

細胞は観察前日に dish に撒き、生きたままの状態もしくは免疫染色後に観察した。写真の撮影には、共焦点顕微鏡（LSM510meta）または超解像顕微鏡（Nikon structured illumination system）を用いた。3 次元構築写真は z 軸方向に 200 nm 毎の写真を撮影し、それを NIS-Elements（ニコン社）を用いて 3 次元構築した。

細胞抽出液の調製法

培養 dish 上の細胞を PBS (4℃) で 3 回洗浄した後、PBS を加えてセルスクレーパー (AGC テクノグラス社) で細胞を掻き取った。その細胞懸濁液をマイクロチューブに移し、4,500 rpm で 5 分間遠心することで細胞を回収した。上清を除去し、回収した細胞に extraction buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 2 mM EDTA, 0.1 M KCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1% TritonX-100) と 1% プロテアーゼ阻害剤カクテルを加えて超音波処理 (破碎) した。氷温中に 20 分間静置後、13,000 rpm で 20 分間遠心した上清を細胞抽出液として実験に用いた。

タンパク質定量法

Western blot 法で用いるサンプルのタンパク質濃度について、BCA 法 (BCA protein assay kit : サーマフィッシャー・サイエンティフィック社) により決定した。

標準タンパク質溶液として、0.00, 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 mg/ml の BSA 溶液を作製し、サンプルは適宜希釈して BCA 混合溶液とよく混和し 37℃ で 30 分間反応させた。反応後、562 nm の波長でそれぞれの吸光度を測定した。標準タンパク質溶液の測定結果から検量線を作成しサンプル濃度を決定した。

Western blot 法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、泳動ゲルからタンパク質を PVDF 膜に転写した。転写は転写溶液 (0.1 M Tris, 0.192 M Glycine, 5% methanol) を用いてセミドライ式 (2 mA/cm² で 60 分間) で行った。転写した PVDF 膜は 5% スキムミルク/PBS-T (0.05% Tween-20 添加 PBS) 溶液にて 1 時間ブロッキングした後に PBS-T で数回洗浄した。次

に、検出するタンパク質に対する抗体（一次抗体）を適宜 PBS-T で希釈した溶液と反応させた。1 時間後、PBS-T で 5 分間 3 回洗浄を繰り返し、一次抗体に対する二次抗体（HRP 標識抗体）を適宜 PBS-T で希釈した溶液と 1 時間反応させた。検出には ECL 試薬（GE ヘルスケア社）を用いて行った。ECL 試薬は二次抗体に結合している HRP と反応し、目的とするタンパク質の位置（バンド）で化学発光する。これにより X 線フィルムを感光させることで目的タンパク質を検出することができる。

免疫沈降法

調製した細胞抽出液に免疫沈降する目的タンパク質の抗体を加え 4℃で 30 分間反応させた。mVenus 融合タンパク質の場合は mVenus を認識する抗 EGFP 抗体を用い、FLAG 融合タンパク質の場合は抗 FLAG 抗体（M2 モノクローナル抗体：シグマ・アルドリッチ社）を用いた。反応後、形成された抗原抗体複合体を分離するために、抗体精製用アフィニティー担体（protein A sepharose : GE ヘルスケア社）の 50%溶液を 20 μ l 加え 4℃で一晩転倒攪拌した。13,000 rpm で 1 分間遠心し sepharose を沈殿させ、上清を除去した。sepharose 洗浄のために extraction buffer（20 mM Hepes-KOH（pH 7.2），2 mM EDTA，0.1 M KCl，1 mM PMSF，1 mM DTT，1% TritonX-100）を加え、4℃で 5 分間転倒攪拌後、13,000 rpm で 1 分間遠心した。この操作を 3 回繰り返して洗浄した後、回収した sepharose を 5×sample buffer（100 mM Tris-HCl（pH 8.8），5% SDS，10 mM EDTA，40% glycerol，5% β -mercaptoethanol，0.01% bromophenol blue）で懸濁して熱処理（95℃で 5 分間）し、遠心後の上清を SDS-アクリルアミドゲル電気泳動した。目的タンパク質の免疫沈降状態や共沈降タンパク質の解析は Western blot 法によって行った。免疫沈降に用いた抗体と Western blot 法の一次抗体が同じ動物種由来の場合、バックグラウンドを軽減するために二次抗体には Clean-Blot 試薬（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社）を用いた。

Opsonized FITC-zymosan を用いたファゴサイトーシス効率の測定法

FITC-zymosan (インビトロジェン社) は、これと同量の Opsonization Reagent を加えて 37°C で 1 時間オプソニン化した。その後 4,000 rpm で 5 分間遠心して上清を除去し、沈殿に PBS を加えて攪拌後に再度遠心することで洗浄し、これを 3 回繰り返した。洗浄後に RPMI-1640 培地に懸濁 (OFZ 溶液) し測定に用いた (1 細胞あたり OFZ 30 個の割合で使用する)。

細胞は、測定日前日に 24 well-dish に 1 well あたり 0.75×10^6 の細胞数になるように撒いた。測定時には、750 μ l の RPMI-1640 培地を交換して 37°C で 1 時間培養した後に培地を 450 μ l 除去、OFZ 溶液を加えて 37°C で 1 時間反応させた。反応後、PBS (4°C) で 3 回洗浄し過剰の OFZ を除いた。細胞外の OFZ を消光させるために、各 well に 2.5 mg/ml Trypan Blue 添加 PBS を加えた。3 分間静置後、Trypan Blue 添加 PBS を除去してプレートリーダー (PLATE CHAMELEON V : HIDEX 社) で取り込まれた OFZ の蛍光強度を測定した (ex 485 nm/em 535 nm)。

また、細胞膜と OFZ との接触効率の測定の場合は 750 μ l の RPMI-1640 培地を交換して 37°C で 1 時間培養した後に培地を 450 μ l 除去、OFZ 溶液を加えて氷上に 30 分間静置することで細胞表面に OFZ を結合させた。その後、PBS (4°C) で 3 回洗浄し過剰の OFZ を除き、PBS で希釈した 4% PFA を加えて細胞を固定しプレートリーダーで OFZ の蛍光強度を測定した。

Opsonized Texas Red-zymosan を用いたファゴサイトーシス効率の測定法

Texas Red-zymosan (インビトロジェン社) は、これと同量の Opsonization Reagent (ザイモサン特異的な IgG 溶液 : インビトロジェン社) を加えて 37°C で 1 時間オプソニン化した。その後 4,000 rpm で 5 分間遠心して上清を除去し、沈殿に PBS を加えて攪拌後に

再度遠心することで洗浄し、これを 3 回繰り返した。洗浄後に RPMI-1640 培地に懸濁 (OTRZ 溶液) し測定に用いた (1 細胞あたり OTRZ 30 個の割合で使用する)。

細胞は、測定日前日に 24 well-dish に 1 well あたり 0.75×10^6 の細胞数になるように撒いた。測定時には、750 μ l の RPMI-1640 培地を交換して 37°C で 1 時間培養した後に培地を 450 μ l 除去、OTRZ 溶液を加えて 37°C で 1 時間反応させた。反応後、PBS (4°C) で 3 回洗浄し過剰の OTRZ を除いた。細胞外の OTRZ を消光させるために、各 well に 0.25 mg/ml Trypan Blue 添加 PBS を加えた。3 分間静置後、Trypan Blue 添加 PBS を除去してプレートリーダー (Varioskan Flash : サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) で取り込まれた OTRZ の蛍光強度を測定した (ex 565 nm/em 615 nm)。

また、細胞膜と OTRZ との接触効率の測定の場合は 750 μ l の RPMI-1640 培地を交換して 37°C で 1 時間培養した後に培地を 450 μ l 除去、OTRZ 溶液を加えて氷上に 30 分間静置することで細胞表面に OTRZ を結合させた。その後、PBS (4°C) で 3 回洗浄し過剰の OTRZ を除き、PBS で希釈した 4% PFA を加えて細胞を固定しプレートリーダーで OTRZ の蛍光強度を測定した。

細胞外に放出される活性酸素種の測定法

細胞は、測定日前日に直径 35 mm の dish に 1 枚あたり 3.0×10^6 の細胞数になるように撒いた。測定時には、これを HBSS (37°C) で 3 回洗浄し、1.4 ml の HBSS と 100 μ l の Diogenes luminol reagent (ナショナル・ダイアグノスティックス社) を加え、30°C に保温したルミノメーター (GloMax 20/20n Luminometer) で 1 分間に 1 回の割合で 5 分間測定した。その後、0.1 mg/ml PMA を 1.5 μ l 加え (最終濃度 0.1 μ g/ml)、同様に 20 分間測定した。

本測定法では、細胞外に放出された活性酸素種と培地中のルミノール基質との反応により発生する化学発光量 (relative light units : RLUs) をモニターすることで、活性酸素

量を定量できる。PMA はホルボールエステル的一种で、ある種のキナーゼを活性化するが、好中球やマクロファージではその結果として細胞外への活性酸素の放出が惹起される。

ファゴソーム内部の活性酸素種産生量の測定法

細胞は、測定日の前日に直径 35mm の dish に 1 枚あたり 3.0×10^6 の細胞数になるように撒いた。測定時には、これを 5 分間氷上で静置した後に 4°C の HBSS で 3 回洗浄し、750 μ l の HBSS と 25 μ l のルミノールビーズ溶液(鎌倉テクノサイエンス社)を加えた(最終的に、1 細胞あたりルミノールビーズ 25~40 個の割合で使用する)。dish 上の細胞にルミノールビーズが均一に覆うように 1,000 rpm で 2 分間遠心した後、37°C に保温した 750 μ l の HBSS を加えた。これを 30°C に保温したルミノメーター (GloMax 20/20n Luminometer : プロメガ社) により 1 分間に 1 回の割合で 15 分間測定した。

ルミノールビーズは、径が 1.5~2.0 μ m のアクリル系ポリマー微粒子にルミノールが結合したもので、ファゴサイトーシスにより細胞に取り込まれた後、ファゴソーム内部で産生される活性酸素と反応し化学発光する。

ファゴソーム単離法

実験にはラテックスビーズ (0.8 μ m, blue dyed : シグマ・アルドリッチ社) を用いた。この 10% 溶液 160 μ l と PBS 560 μ l、そしてヒトの IgG (10 mg/ml) 80 μ l を混合して 37°C で 2 時間反応させることでビーズ表面に IgG の Fc 部分を結合させた。その後、これを 7,000 rpm で 3 分間遠心して上清を除去し、PBS を加えてさらに遠心、上清除去した。この操作を 3 回繰り返すことによりビーズを洗浄した後で、760 μ l の PBS と 40 μ l のヒト

に対するウサギの IgG (2 mg/ml) を加えて 37°C で 1 時間反応させてオプソニン化した。この反応により、ウサギの IgG の Fc 部分はビーズの外側に露出することになり、マクロファージの Fc 受容体に認識されやすくなることが期待できる。先と同様に PBS でビーズを洗浄し、これを 8 ml の培地 (4°C) で懸濁して実験に用いた (dish 8 枚分のビーズ溶液)。

細胞は直径 10 cm の dish に撒き (1 組 4 枚使用)、ビーズを加えて 37°C で 10 分間取り込ませた条件 (10 分チェイス・その後の培養なし : 10/0) と 10 分取り込ませた後に 120 分間培養した条件 (10 分チェイス・120 分培養 : 10/120) で実験を行った。

具体的には、細胞は実験開始の 2~3 時間前に 4 ml の培地を加え 37°C で 2~3 時間培養し、10 分間 4°C で静置した。培地 (4°C) を 4 ml 交換し、培地 (4°C) に懸濁したオプソニン化ビーズを 1 ml を加えてビーズが dish 上の細胞を均一に覆うように 4°C で 20 分間静置した。その後 37°C で 10 分間培養することにより細胞にビーズを取り込ませ (10 分間のチェイス)、PBS (4°C) で 3 回洗浄してセルスクレーパーで細胞を掻き取った (その後の培養なし : 10/0)。また、もう 1 組は PBS 洗浄後、培地を加えて 120 分間 37°C で培養した後で細胞を掻き取った (120 分培養 : 10/120)。この細胞懸濁液をチューブに移し、1,200 rpm で 5 分間遠心した。遠心後に上清を除去し、回収した細胞に 500 μ l の homogenization buffer (250 mM sucrose, 3 mM Imidazole (pH 7.4), 1% プロテアーゼ阻害剤カクテル) を加えてダウンスホモゲナイザーで均質に細胞を破碎した。これをマイクロチューブに移し、1,200 rpm で 10 分間遠心し、その上清に ATP (最終濃度 10 mM) と MgCl₂ (最終濃度 4 mM) を加えて 15 分間氷上に放置し、これを extract (post-nuclear supernatants : PNS) とした。extract は Western blot 解析用に一部取った。extract と等量の 62% sucrose を加えて混和したものを、超遠心チューブに入れた 500 μ l の 62% sucrose に重層した。さらにその上に 1 ml ずつ 35% sucrose, 25% sucrose, 10% sucrose の順に重層し、これを 37,000 rpm (100,000 $\times g$) で 1 時間遠心した (himac CS100GXL : 日立工機社)。これにより 10% sucrose と 25% sucrose の間にファゴソームを分画できる。単離したファ

ゴソームをマイクロチューブに移し、1 ml の 3 mM Imidazole (pH 7.4) を加えて 13,000 rpm で 10 分間遠心することでファゴソームを沈殿させ回収した。実験には、回収したファゴソームを extraction buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 2 mM EDTA, 0.1 M KCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1% TritonX-100) に懸濁し、タンパク質定量した後に用いた。

pHrodo-*Staphylococcus aureus* を用いたファゴソーム酸性化の測定法

pHrodo-*Staphylococcus aureus* (pHrodo-*S. aureus*) 溶液 (インビトロジェン社) は、その半量の Opsonization Reagent (*S. aureus* 特異的な IgG 溶液: インビトロジェン社) により 37°C でオプソニン化した。1 時間後、7,000 rpm で 5 分間遠心し pHrodo-*S. aureus* を沈殿させ上清を除去した。この沈殿を HBSS に再懸濁し遠心すること (3 回繰り返す) によって洗浄した。これを 20 μ l/well となるように HBSS で懸濁したものを用いた。

細胞は、測定日前日に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒いた。測定前に培地を 1 ml 交換して 37°C で 1 時間培養した後に、5 分間氷上に放置した。これを HBSS (4°C) で 3 回洗浄し、180 μ l の HBSS と 20 μ l の pHrodo-*S. aureus* を加えてよく混和し氷上に 10 分間静置することで細胞表面に pHrodo-*S. aureus* を結合させた。その後、HBSS (4°C) で 3 回洗浄し、37°C に保温した HBSS を 2 ml 加えて蛍光顕微鏡 (ECLIPS TE2000-U: ニコン社) で観察した。0, 15, 30, 45, 90 分毎に写真を撮影し蛍光強度を定量した。なお、撮影した写真の定量には MetaMorph イメージングソフト (ユニバーサルイメージング社) を用いた。

GFP 結合ビーズを用いたファゴソーム成熟化の解析法

ラテックスビーズ (直径 3.0 μ m) と精製した GFP 溶液 (1.5 mg/ml) を遮光した状態

で 12 時間混和することで、ビーズに GFP を結合させた。その後 7,000 rpm で 3 分間遠心して上清を除去し HBSS を加えてさらに遠心、上清を除去することを 3 回繰り返して洗浄した。それをオプソニン化するために抗 EGFP 抗体を加え 37°C で 2 時間反応させ、同様に HBSS で洗浄し実験に用いた。

細胞は TagRFP 付加 FcγRIIA を安定発現する J774 細胞に siRNA をトランスフェクションし、測定前日に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒いた。測定前に培地を 2 ml 交換して 37°C で 1 時間培養した後に、氷上に 5 分間放置し HBSS (4°C) で 3 回洗浄した。dish あたり 1.5×10^7 個の GFP 結合ビーズを加えて 30 分間静置することで細胞表面にビーズを結合させ、その後 32°C に 5 分間おくことでビーズを取り込ませた。過剰なビーズは HBSS (4°C) で 3 回洗浄することで取り除き、サイトカラシン B (最終濃度 20 μM) を添加した HBSS (32°C) を 1 ml 加え、32°C で 5, 15, 30 分間培養した。培養後は HBSS (4°C) で 3 回洗浄し、150 mM NaCl 添加 50 mM citrate buffer (pH 4.0) を加えることで細胞外の GFP 結合ビーズを消光した。共焦点顕微鏡 (LSM510meta) を用いてこれを観察し、GFP ビーズの蛍光の強さによってファゴソームを 4 種類に分類した。細胞内に取り込まれたファゴソームの総数を 100%としたときのそれぞれの割合を計算し、ファゴソームの成熟化を検証した。

LysoTracker を用いたファゴソーム酸性化の測定法

細胞は、測定日前日に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒いた。測定前に培地を 2 ml 交換して 37°C で 1 時間培養した後に、LysoTracker (インビトロジェン社) を最終濃度 50 nM となるように加えて 37°C で 20 分間培養した。その後氷上に 5 分間放置した後に HBSS (4°C) で 3 回洗浄し、95 μl の HBSS と 5 μl のオプソニン化ラテックスビーズ溶液 (1 細胞あたりビーズ 20 個の割合で使用する) を加えてよく混和し氷上に 30 分間静置することで細胞表面にビーズを結合させた。それを

30℃で5分間ファゴサイトーシスさせ、HBSS（4℃）で3回洗浄することで過剰なビーズを除去した。この時点で細胞内に取り込まれていないビーズを染色するため Alexa 標識二次抗体（インビトロジェン社）と、これ以降の操作中での取り込みを阻害するため サイトカラシン B（最終濃度 20 μ M）を含む 200 μ l の HBSS（4℃）を加えて氷上で20分間放置し、その後 HBSS（4℃）で3回洗浄した。これにサイトカラシン B（最終濃度 20 μ M）添加 1ml HBSS（30℃）を加えて 32℃で 5, 15, 30 分培養した後に共焦点顕微鏡（LSM510meta）により写真撮影した。撮影した写真を基に、取り込まれたファゴソームについて LysoTracker で染色されたファゴソームとされていないファゴソームに分類し、取り込まれたファゴソームの総数を 100%としたときの染色されたファゴソームの割合を計算した。

また、LysoTracker による細胞内の酸性オルガネラの染色について調べるため、測定日前日に 24 well-dish に 1 well あたり 0.75×10^6 の細胞数になるように細胞を撒いた。測定時には、培地を 750 μ l 交換して 37℃で1時間培養した後に、LysoTracker を最終濃度 50 nM となるように加えて 37℃で20分間培養した。培養後は HBSS で3回洗浄しプレートリーダー（Varioskan Flash）で LysoTracker の蛍光強度を測定した（ex 564 nm/em 615 nm）。

Rhodamine B-dextran を用いたファゴソーム - ライソゾーム融合の解析法

siRNA をトランスフェクションした細胞を測定日前日に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒いた。その後 Rhodamine B-dextran（RB-dextran：インビトロジェン社）を最終濃度 50 μ g/ml となるように加え 37℃で12時間培養することで細胞内に RB-dextran を取り込ませた。測定前に培地を 2 ml 交換して 37℃で5時間培養した後に氷上に15分間放置した。そして HBSS（4℃）で3回洗浄し、95 μ l の HBSS と 5 μ l のオプソニン化ラテックスビーズ溶液（1細胞あたりビーズ20個の割合で使用する）を加えてよく混和し氷上に30分間静置することで細胞表面にビー

ズを結合させた。それを 30℃で 5 分間ファゴサイトーシスさせ、HBSS (4℃) で 3 回洗浄することで過剰なビーズを除去した。この時点で細胞内に取り込まれていないビーズを染色するため Alexa 標識二次抗体と、これ以降の操作中での取り込みを阻害するため サイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) を含む 200 μ l の HBSS (4℃) を加えて氷上で 20 分間放置し、その後 HBSS (4℃) で 3 回洗浄した。これにサイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) 添加 1ml HBSS (30℃) を加えて 32℃で 0, 15, 30 分培養した後に共焦点顕微鏡 (LSM510meta) により写真撮影した。撮影した写真を基に、取り込まれたファゴソームについて RB-dextran で染色されたファゴソームとされていないファゴソームに分類し、取り込まれたファゴソームの総数を 100%としたときの染色されたファゴソームの割合を計算した。

また、RB-dextran による細胞内ライソゾームの染色について調べるため、測定日前日に 24 well-dish に 1 well あたり 0.75×10^6 の細胞数になるように細胞を撒いた。そして RB-dextran を最終濃度 50 μ g/ml となるように加え 37℃で 12 時間培養した。測定時には、培地を 750 μ l 交換して 37℃で 5 時間培養した後に、HBSS で 3 回洗浄しプレートリーダー (Varioskan Flash) で RB-dextran の蛍光強度を測定した (ex 543 nm/em 590 nm)。

LysoTracker を用いた SNAP-23 の機能回復に関する解析法

SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞を測定日前日に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒き、37℃で 4 時間培養した。4 時間後に mVenus 融合タンパク質をトランスフェクションすることで一過的に過剰発現させた。測定前に培地を 2 ml 交換して 37℃で 1 時間培養した後に、LysoTracker を最終濃度 50 nM となるように加えて 37℃で 20 分間培養した。その後氷上に 5 分間放置した後に HBSS (4℃) で 3 回洗浄し、95 μ l の HBSS と 5 μ l のオプソニン化ラテックスビーズ溶液 (1 細胞あたりビーズ 20 個の割合で使用する) を加えてよく混和し氷上に 30 分

間静置することで細胞表面にビーズを結合させた。それを 30℃で 5 分間ファゴサイトーシスさせ、HBSS (4℃) で 3 回洗浄することで過剰なビーズを除去した。この時点で細胞内に取り込まれていないビーズを染色するため Alexa 標識二次抗体と、これ以降の操作中での取り込みを阻害するためサイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) を含む 200 μ l の HBSS (4℃) を加えて氷上で 20 分間放置し、その後 HBSS (4℃) で 3 回洗浄した。これにサイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) 添加 1 ml HBSS (30℃) を加えて 32℃で 15 分培養した後に共焦点顕微鏡 (LSM510meta) により写真撮影した。撮影した写真を基に、取り込まれたファゴソームについて LysoTracker で染色されたファゴソームとされていないファゴソームに分類し、取り込まれたファゴソームの総数を 100%としたときの染色されたファゴソームの割合を計算した。

Rhodamine B-dextran を用いた SNAP-23 の機能回復に関する解析法

SNAP-23 siRNA をトランスフェクションした細胞に、測定日前日に RB-dextran (最終濃度 50 μ g/ml) を加え 37℃で 8 時間培養することで細胞内に RB-dextran を取り込ませた。8 時間経過後に直径 35 mm のガラス底 dish に 1 枚あたり 0.75×10^6 の細胞数となるように撒くと同時に RB-dextran を含まない培地に交換した。その後 37℃で 2 時間培養し、mVenus 融合タンパク質をトランスフェクションすることで一過的に過剰発現させた。測定前には培地を 2 ml 交換して 37℃で 5 時間培養した後に氷上に 15 分間放置した。そして HBSS (4℃) で 3 回洗浄し、95 μ l の HBSS と 5 μ l のオプソニン化ラテックスビーズ溶液 (1 細胞あたりビーズ 20 個の割合で使用する) を加えてよく混和し氷上に 30 分間静置することで細胞表面にビーズを結合させた。それを 30℃で 5 分間ファゴサイトーシスさせ、HBSS (4℃) で 3 回洗浄することで過剰なビーズを除去した。この時点で細胞内に取り込まれていないビーズを染色するため Alexa 標識二次抗体と、これ以降の操作中での取り込みを阻害するためサイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) を含む 200 μ l の

HBSS (4°C) を加えて氷上で 20 分間放置し、その後 HBSS (4°C) で 3 回洗浄した。これにサイトカラシン B (最終濃度 20 μ M) 添加 1 ml HBSS (30°C) を加えて 32°C で 15 分培養した後に共焦点顕微鏡 (LSM510meta) により写真撮影した。撮影した写真を基に、取り込まれたファゴソームについて RB-dextran で染色されたファゴソームとされていないファゴソームに分類し、取り込まれたファゴソームの総数を 100%としたときの染色されたファゴソームの割合を計算した。

FRET 解析法

細胞は測定日前日に直径 35 mm のガラス底 dish に用意し、37°C で 6 時間培養後にプラスミド (FRET プローブと Myc タグを付加した SNARE タンパク質) をトランスフェクションし、翌日観察した。観察は、細胞膜上の FRET 解析の場合には HBSS で 3 回洗浄後に HBSS を 1 ml 加えた状態で行った。また、ファゴソーム膜上での FRET 解析の場合は、HBSS での 3 回の洗浄後にオプソニン化したザイモサンを細胞に与え (1 細胞あたりザイモサン 30 個の割合で使用する)、37°C で 20 分間ファゴサイトーシスさせた。その後 HBSS で 3 回洗浄することで過剰なザイモサンを除去し、1 ml の HBSS を加えた状態で観察した。共焦点顕微鏡 (LSM510meta) を用いて細胞膜上もしくはファゴソーム膜上のスペクトル計測を行い、ドナー側の蛍光タンパク質 (TagGFP) の蛍光波長である 505 nm とアクセプター側の蛍光タンパク質 (TagRFP) の蛍光波長である 580 nm とのスペクトル比を FRET 効率とした。

6. 謝辞

本研究に際し、終始変わらぬ懇切な御教示、御督励を賜りました鳥取大学 医学部 生命科学科 分子細胞生物学講座 分子生物学分野の初沢清隆教授および福島県立医科大学 医学部附属生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門の和田郁夫教授、また研究を支えて頂いた同部門研究室の方々に謹んで感謝の意を表します。

ファゴサイトーシス効率の測定については、福島県立医科大学 医学部附属生体情報伝達研究所 生体物質研究部門の本間好教授および福島県立医科大学 医学部 生化学講座の橋本康弘教授に御協力頂きました。ここに感謝致します。

抗 a3 サブユニット抗体を頂きました大阪大学 産業科学研究所 第3研究部門 医薬品化学研究分野の和田洋准教授および同志社女子大学 薬学部 医療薬学科 生化学研究室の和田戈虹教授、抗 SNAP-23 Ser95 リン酸化特異的抗体を頂きました北里大学 医学部 生化学単位 神経科学グループの高橋正身教授および板倉誠講師に深謝致します。

また、本研究は日本学術振興会の科学研究費補助金（若手研究（B）25860218）の助成を受けたものです。

7. 略語

● AA	amino acid
● ATP	adenosine-5'-triphosphate
● ATPase	adenosine triphosphatase
● BCA	bicinchoninic acid
● BSA	bovine serum albumin
● CD	cluster of differentiation
● cDNA	complementary DNA
● DMEM	dulbecco's modified eagle medium
● DNA	deoxyribonucleic acid
● DTT	dithiothreitol
● ECL	enhanced chemiluminescence
● EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
● EGFP	enhanced green fluorescent protein
● ER	endoplasmic reticulum
● FBS	fetal bovine serum
● FcR	Fc receptor
● FcγR	Fc gamma receptor
● FITC	fluorescein isothiocyanate
● FRET	fluorescence resonance energy transfer
● GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
● GFP	green fluorescent protein
● GST	glutathione S-transferase

● GTP	guanosine triphosphate
● HBSS	hanks' balanced salt solutions
● HEK293T	human embryonic kidney 293
● HRP	horseradish peroxidase
● IgG	immunoglobulin G
● IKK	inhibitor κ B kinase
● IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
● LAMP-1	lysosome-associated membrane protein-1
● LB	lysogeny broth
● MHC	major histocompatibility complex
● mVenus	monomeric Venus
● NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
● NOX2	NADPH oxidase complex 2
● NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
● PBS	phosphate-buffered saline
● PCR	polymerase chain reaction
● PEI	polyethylenimine
● PFA	paraformaldehyde
● phox	phagocyte oxidase
● PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
● PKC	protein kinase C
● PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
● PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
● PNS	postnuclear supernatant
● PVDF	polyvinylidene difluoride

● Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
● RB-dextran	rhodamine B-conjugated dextran
● RFP	red fluorescence protein
● RLUs	relative light units
● RNA	ribonucleic acid
● ROS	reactive oxygen species
● RPMI	roswell park memorial institute
● SDS	sodium dodecyl sulfate
● siRNA	small interfering RNA
● SNAP	soluble NSF attachment protein
● SNAP-25	synaptosomal-associated protein of 25 kDa
● SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
● TAP	transporter in antigen processing
● TMD	transmembrane domain
● TNF	tumor necrosis factor
● Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
● TLR	toll-like receptor
● t-SNARE	target membrane SNARE
● VAMP	vesicle-associated membrane protein
● V-ATPase	vacuolar type H ⁺ -ATPase
● v-SNARE	vesicle-associated SNARE

8. 引用文献

1. Jutras, I. and M. Desjardins, *Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 511-27.
2. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev, 2007. 219: p. 143-56.
3. Trost, M., et al., *The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages*. Immunity, 2009. 30(1): p. 143-54.
4. Swanson, J.A., *Shaping cups into phagosomes and macropinosomes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(8): p. 639-49.
5. Hackam, D.J., et al., *v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11691-6.
6. Haas, A., *The phagosome: compartment with a license to kill*. Traffic, 2007. 8(4): p. 311-30.
7. Stow, J.L., A.P. Manderson, and R.Z. Murray, *SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(12): p. 919-29.
8. Garin, J., et al., *The phagosome proteome: insight into phagosome functions*. J Cell Biol, 2001. 152(1): p. 165-80.
9. Gagnon, E., et al., *Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages*. Cell, 2002. 110(1): p. 119-31.
10. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells*. Nature, 2003. 425(6956): p. 397-402.

11. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation*. Nature, 2003. 425(6956): p. 402-6.
12. Ackerman, A.L., A. Giodini, and P. Cresswell, *A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells*. Immunity, 2006. 25(4): p. 607-17.
13. Touret, N., et al., *Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation*. Cell, 2005. 123(1): p. 157-70.
14. Hatsuzawa, K., et al., *Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis*. Mol Biol Cell, 2006. 17(9): p. 3964-77.
15. Cebrian, I., et al., *Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells*. Cell, 2011. 147(6): p. 1355-68.
16. Fairn, G.D. and S. Grinstein, *How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes*. Trends Immunol, 2012. 33(8): p. 397-405.
17. Sollner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature, 1993. 362(6418): p. 318-24.
18. Jahn, R. and T.C. Sudhof, *Membrane fusion and exocytosis*. Annu Rev Biochem, 1999. 68: p. 863-911.
19. Bock, J.B., et al., *A genomic perspective on membrane compartment organization*. Nature, 2001. 409(6822): p. 839-41.
20. Bajno, L., et al., *Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation*. J Cell Biol, 2000. 149(3): p. 697-706.

21. Braun, V., et al., *TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages*. *Embo J*, 2004. 23(21): p. 4166-76.
22. Ho, Y.H., et al., *Vesicle-associated membrane protein-8/endobrevin negatively regulates phagocytosis of bacteria in dendritic cells*. *J Immunol*, 2008. 180(5): p. 3148-57.
23. Becker, T., A. Volchuk, and J.E. Rothman, *Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2005. 102(11): p. 4022-4026.
24. Hatsuzawa, K., et al., *Sec22b is a negative regulator of phagocytosis in macrophages*. *Mol Biol Cell*, 2009. 20(20): p. 4435-43.
25. Collins, R.F., et al., *Syntaxins 13 and 7 function at distinct steps during phagocytosis*. *J Immunol*, 2002. 169(6): p. 3250-6.
26. Vieira, O.V., et al., *Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase*. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(7): p. 2501-14.
27. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully*. *Biochem J*, 2002. 366(Pt 3): p. 689-704.
28. Hackam, D.J., et al., *Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. Syntaxins 2, 3, and 4 are present on phagosomal membranes*. *J Immunol*, 1996. 156(11): p. 4377-83.
29. Mollinedo, F., et al., *Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils*. *J Immunol*, 2006. 177(5): p. 2831-41.
30. Martin-Martin, B., et al., *Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis*. *Blood*, 2000. 96(7): p. 2574-83.

31. Murray, R.Z., et al., *A role for the phagosome in cytokine secretion*. Science, 2005. 310(5753): p. 1492-5.
32. Kawanishi, M., et al., *Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2*. J Biol Chem, 2000. 275(11): p. 8240-7.
33. Rada, B.K., et al., *Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing*. Blood, 2004. 104(9): p. 2947-53.
34. Leto, T.L., et al., *Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases*. Antioxid Redox Signal, 2009. 11(10): p. 2607-19.
35. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. 411(6836): p. 494-8.
36. An, S.J. and W. Almers, *Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells*. Science, 2004. 306(5698): p. 1042-6.
37. Wang, L., et al., *The structural and functional implications of linked SNARE motifs in SNAP25*. Mol Biol Cell, 2008. 19(9): p. 3944-55.
38. Suzuki, K. and I.M. Verma, *Phosphorylation of SNAP-23 by IkappaB kinase 2 regulates mast cell degranulation*. Cell, 2008. 134(3): p. 485-95.
39. Ueyama, T., et al., *A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox*. Mol Biol Cell, 2007. 18(2): p. 441-54.
40. Paumet, F., et al., *Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment*. J Immunol, 2000. 164(11): p. 5850-7.

41. Puri, N., et al., *Mast cell degranulation requires N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated SNARE disassembly*. J Immunol, 2003. 171(10): p. 5345-52.
42. Hibi, T., N. Hirashima, and M. Nakanishi, *Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(1): p. 36-41.
43. Valdez, A.C., et al., *Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network*. J Cell Sci, 1999. 112 (Pt 6): p. 845-54.